

漢方薬およびその成分によるアクアポリン調節作用の薬理学的意義に関する研究

申請代表者 磯濱洋一郎 熊本大学大学院生命科学研究部薬物活性学分野 准教授
所内共同研究者 宮田 健 病態制御部門 機能情報解析分野 客員教授
(H24.3.31まで)

【報告セミナー要旨】

【目的】 和漢薬の中には利尿作用すなわち水分代謝調節作用をもつものがあり、その臨床での効果と密接な関係にあると考えられている。我々は、この利尿作用の一部は水チャネルであるアクアポリン(AQP)の機能または発現の調節によるのではないかと仮説のもと研究に着手し、既に五苓散および猪苓湯によるAQP類の阻害作用および荊芥によるAQP3発現促進作用などを明らかにしてきた。一方、近年では、AQP類が細胞膜での水分子の移動を促進するだけでなく、細胞の増殖や遊走能など、様々な細胞機能に関わっていることも明らかになってきた。すなわち、これらAQP調節作用をもつ薬物は、その作用を通じてAQPが関わる種々の細胞機能へ影響する可能性が考えられ、これが和漢薬のもつ薬理作用にも関わっている可能性がある。本研究では、漢方方剤および生薬によるAQP調節作用の細胞生物学および薬理学的な意義を詳細に解明することを目的とした。

【結果および考察】 まず、AQP3の発現亢進作用をもつ荊芥は、同時にケラチノサイト細胞株DJM-1の遊走能を促進することが分ったが、本作用はAQP3 siRNAの処理により消失した。また、本作用のin vivoでの影響を検証するために、ヘアレスマウスの背部皮膚に形成させた実験的創傷の治癒速度を調べたが、荊芥エキスを塗布すると、創傷の治癒速度が有意に速まることが分った。

一方、外分泌腺および肺胞の上皮細胞に豊富に存在するAQP5については、TNF- α 刺激による種々のサイトカイン発現すなわち炎症応答を著明に亢進するという新機能を見出した。本作用はERK阻害薬の存在下では消失し、興味深いことに、AQP類をもたないNIH-3T3細胞にAQP5遺伝子を強制発現させるだけでERKのリン酸化が生じることも分った。内因性AQP5をもつマウス肺上皮細胞株MLE-12細胞を、AQP5阻害作用をもつ五苓散で3時間前処理してTNF- α 刺激すると、五苓散非処理細胞に比べ著明なKC発現の亢進が生じた。また、本作用はAQP5のsiRNA処理によって著明にした。この作用の詳細な機序については未だ不明だが、AQP5を標的とする薬物が上皮細胞のサイトカイン産生すなわち免疫応答に著明な影響を与えたと考えられた。

これらの成績は、AQP類の発現および機能に影響を与える種々の和漢薬が、水代謝のみならず、組織の修復や免疫応答に影響することを示す興味深い知見である。

■背景および目的

「水毒」とは、生体内での水分代謝および分布の異常であり、体内を巡るべき水分の停滞すなわち浮腫や泌尿障害、あるいは、外分泌障害すなわち水の体外排出の異常などの症状として現れる。そして、これらの症状を緩和し、体内の水分代謝を正常化する作用を利尿作用と呼ぶ。代表的な利尿剤は、五苓散のような尿量増加作用が強い方剤であるが、本方剤は浮腫傾向にある場合だけに尿量を増やし、血中の電解質濃度には影響しないなど、西洋医学的な利尿薬とは明らかにその特性が異なっている。

一方、近年になって、細胞膜の水透過性を調節するアクアポリン (aquaporin: AQP) と呼ばれる水チャネルが見出され、現在までに 13 種類のアリソフォームが同定されている。また、各 AQP の欠損マウスが作製され、その表現型の解析が進み、腎臓に存在する AQP1, AQP2 および AQP3 の欠損で尿量の著明な増加が生じることや^{4,6)}、脳のアストログリアにある AQP4 の欠損では脳浮腫の形成が抑制されること⁷⁾、さらに外分泌腺細胞に存在する AQP5 の欠損では唾液、汗および気道液の分泌が低下することなどが分かってきた⁸⁾。すなわち、従来、浸透圧や静水圧といった物理化学的ポテンシャルだけで説明されてきた生体内の水の移動は、AQP により調節される細胞膜の透過性によって、その効率に大きな影響が出るということが分かってきた。

このような背景のもと、我々は、和漢薬のもつ利尿作用の一部が AQP の機能または発現の調節によるのではないかと仮説のもと研究に着手し、既に五苓散が AQP4 をはじめとする複数の AQP 類を阻害し、急性水中毒に伴う脳浮腫の形成を抑制することを見出してきた。

また近年では、AQP をもつ腫瘍細胞では増殖能や遊走能が高まり、その悪性度が増すことが報告されるなど、AQP 類が単に細胞膜での水分子の移動を効率化するだけでなく、様々な細胞機能にも関わっていることが明らかになってきた。すなわち、これら AQP 調節作用をもつ薬物には、その作用を通じて種々の細胞機能へも影響することが考えられる。

そこで本研究では、種々の和漢薬や生薬が AQP 調節作用を介して様々な薬理作用を現している可能性を念頭に、漢方剤および生薬による AQP 調節作用の細胞生物学的および薬理的な意義を解明することを目的とした。

■結果および考察

1. 荊芥エキスによる AQP3 発現亢進の意義

AQP3 は主として皮膚のケラチノサイトに発現し、AQP3 を欠損させた動物では皮膚乾燥症状のみならず創傷治癒の遅延が生じる。すなわち、AQP3 の発現量を調節する薬物には皮膚の保湿および創傷治癒の促進効果が期待できる。そこで本研究ではまず、内因性 AQP3 をもつケラチノサイト細胞株 DJM-1 を実験標本として、AQP3 発現に対する種々の生薬エキスの作用を検討した。その結果、荊芥の MeOH 抽出エキスが著明かつ濃度依存的に AQP3 発現を亢進することを見出した(図 1)。次に、荊芥エキスによる細胞機能への影響を検討するために、DJM-1 細胞の遊走能への作用をスクラッチアッセイ法により調べると、AQP3 発現亢進とよく相関して荊芥は、遊走能を有意に促進した(図 2)。また、本細胞の内因性 AQP3 発現を siRNA により抑制すると細胞遊走能は著明に低下し、さらに荊芥エキスによる遊走促進作用も消失した(図 2)。従って、荊芥エキスによるケラチノサイトの遊走促進作用は AQP3 の発現亢進を介して生じると考えられた。

さらに、本作用の *in vivo* での影響を検討するために、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 の円形の実験的創傷を作製し、この創傷の創傷速度に対する荊芥エキスの作用を調べた。その結果、荊芥エキス (5 µg/site) を含む軟膏を 1 日 1 回塗布した創傷部位は、コントロールとして軟膏基剤 (プラスチックベース) を塗布した創傷部位に比べ、有意に創傷面積の減少速度が早くなった(図 3)。

これらの成績から、ケイガイエキスは AQP3 の発現を亢進することで、ケラチノサイトの遊走を亢進し、これにより創傷治癒を促進することが分かった。

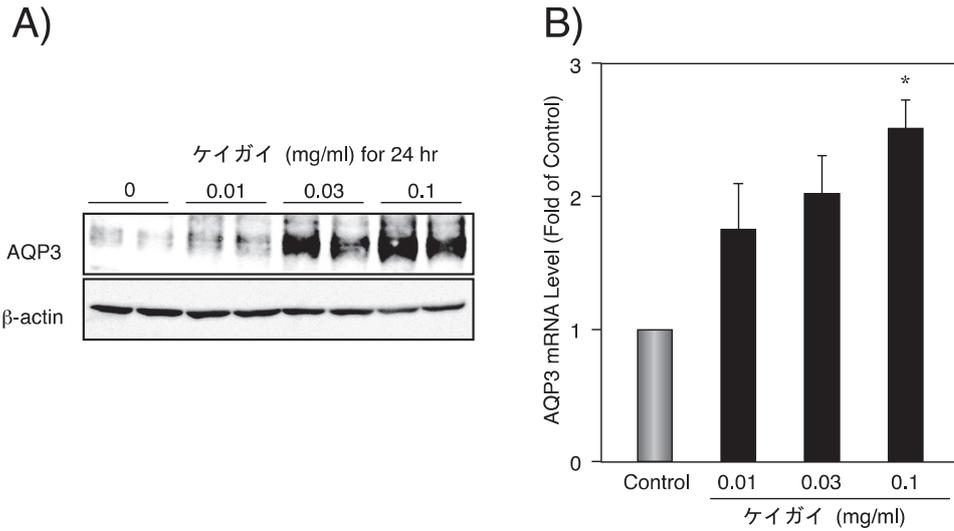


図 1. 荊芥 MeOH 抽出エキスによる AQP3 発現促進作用

ヒトケラチノサイト細胞株DJM-1を荊芥 MeOH 抽出エキス存在下に24時間培養し、AQP3のタンパク質量を Western blot (A), mRNA量をreal-time PCR (B)により測定した. Mean \pm SE (n=4), *: p<0.05 vs. control.

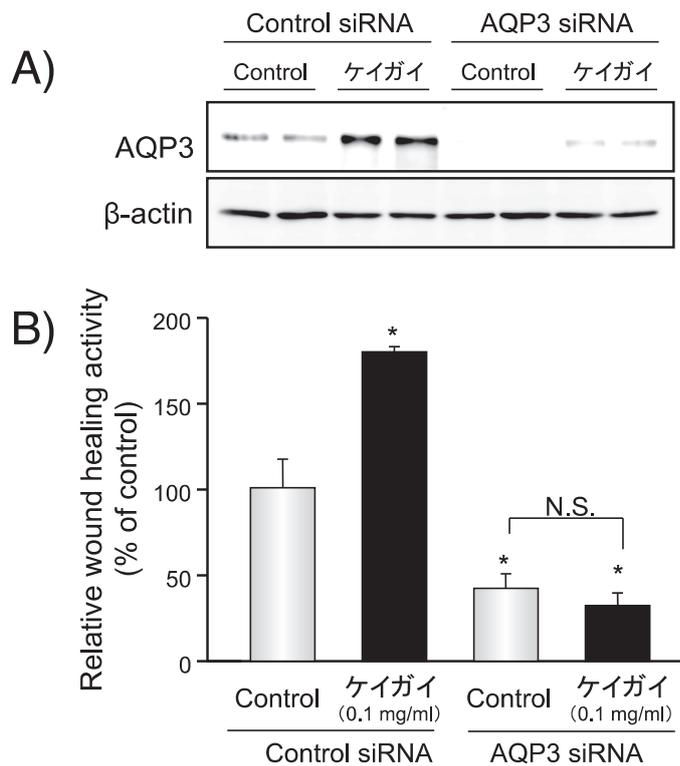


図 2. 荊芥 MeOH 抽出エキスによるケラチノサイト遊走活性の亢進作用

DJM-1細胞を荊芥 MeOH 抽出エキス存在下に24時間培養し、スクラッチアッセイに供した. 荊芥エキスは本細胞の遊走能を亢進したが、AQP3をsiRNAにより欠損させるとその作用は消失した. A: AQP3タンパク質発現量, B: 遊走活性. Mean \pm SE (n=4), *: p<0.05 vs. control treated with control siRNA.

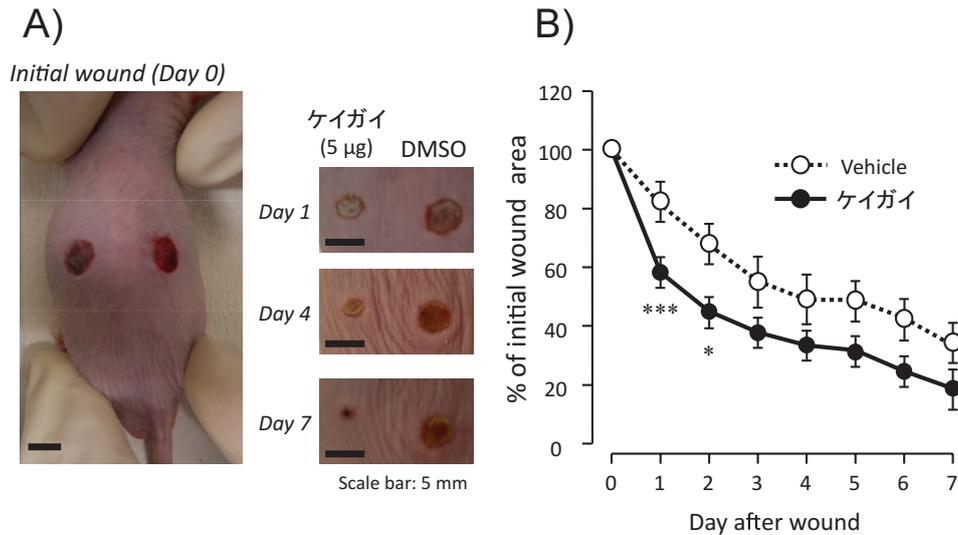


図 3. 荆芥 MeOH 抽出エキスによる実験的創傷治癒促進作用

ヘアレスマウスの背部に直径 5 mm の創傷を形成し、荆芥エキスあるいは溶媒 (DMSO) を含む軟膏を 1 日 1 回塗布し、経日的に創傷部面積を測定した。A: 典型的実験結果の写真, B: 創傷部面積の変化。Mean \pm SE (n=8), *, ***: p<0.05, p<0.001 vs. control.

2. AQP5 による炎症反応の亢進作用

AQP 類が細胞の遊走や増殖に影響することは、本研究を含め、他の研究グループからも報告されている。しかし、血管内皮細胞に存在する AQP1 を除くほとんどの AQP 類は病原微生物を始めとする異物の侵入に対する第一線の生体防御を担う上皮組織に存在する。しかしながら、AQP の有無が上皮細胞の炎症応答へ影響するか否かについては不明である。そこで本研究では、特に肺上皮の内腔側細胞膜に存在するアイソフォームである AQP5 による炎症応答すなわちサイトカイン発現に対する作用を検討した。

内因性 AQP5 をもつマウス肺上皮細胞株 MLE-12 細胞を TNF- α で刺激すると Keratinocyte chemoattractant (KC) の発現を生じるが、本細胞の AQP5 を siRNA により欠損させると、この KC 発現は著明に減弱した。この AQP5 siRNA の効果は、ELISA で測定した培養上清中の KC タンパク質量、real-time PCR による mRNA の両方で認められ、siRNA 導入量依存的に減少した AQP5 量とよく一致した (図 4)。一方、内因性の AQP をもたないマウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞に AQP5 遺伝子を導入すると、TNF- α による KC 発現は AQP5 発現量と相関して著明となった (図 5)。これら、AQP5 の発現抑制および強制発現の両実験系で、AQP5 は KC 発現を亢進することが明らかとなった。なお、この AQP5 による KC の発現亢進は TNF- α だけでなく IL-1 β による刺激にでも同様に生じ、また、KC だけでなく IL-6 および TNF- α といった他のサイトカイン類の mRNA 発現も亢進された (データは示さず)。すなわち、AQP5 は上皮細胞での炎症性刺激応答を亢進すると推定された。

次に、AQP5 による炎症応答の亢進作用の機序を推定するために、種々のサイトカイン発現に関わる転写因子である NF- κ B 活性への影響を調べた。NIH-3T3 細胞に AQP5 遺伝子とともに NF- κ B 応答性のルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し、TNF- α で刺激すると、AQP5 を発現させた細胞で有意に高い NF- κ B 活性を認めた (図 6)。すなわち、AQP5 をもつ細胞は炎症性刺激による NF- κ B の活性化が亢進することで、サイトカイン発現が亢進すると考えられた。

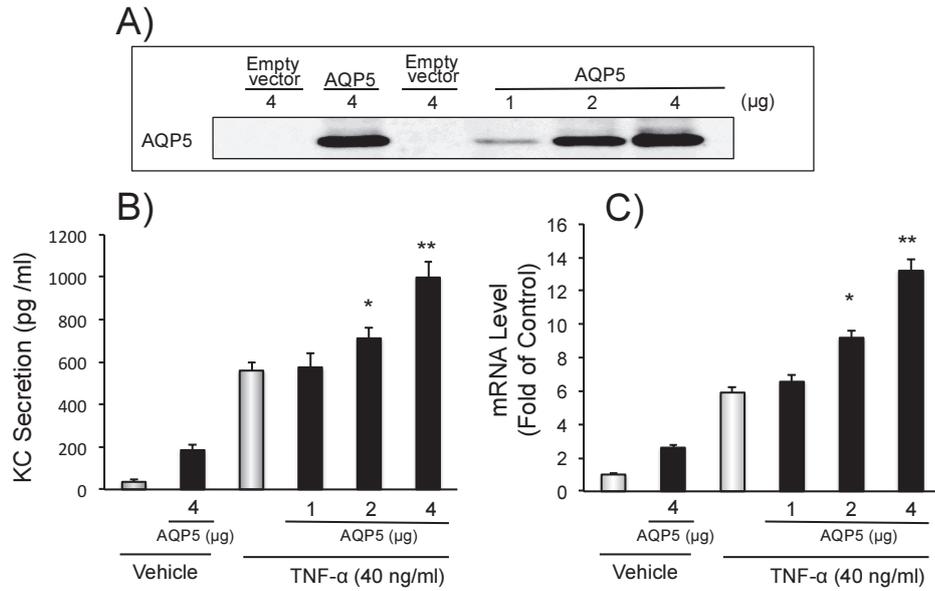


図 4. TNF- α で誘発した NIH-3T3 細胞の KC 発現に対する AQP5 高発現の作用

NIH-3T3細胞にAQP5遺伝子を導入し24時間後にTNF- α (20 ng/ml) で刺激した. A: AQP5のWestern blot, B: TNF- α 添加3時間の培養上清中のKC分泌量 (ELISA). C: TNF- α 添加1時間のKC mRNA発現量 (real-time PCR).

Mean \pm SE (n=4), *, **: p<0.05, p<0.01 vs. vehicle transfected with empty vector.

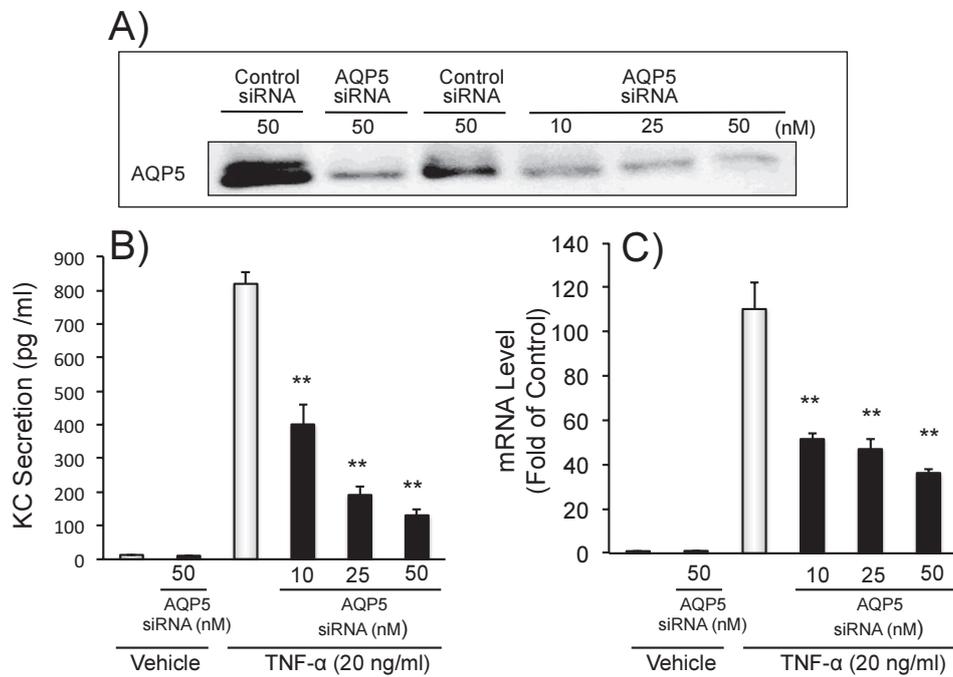


図 5. TNF- α で誘発した MLE-12 細胞の KC 発現に対する AQP5 siRNA の作用

MLE-12細胞にAQP5 siRNAを導入し24時間後にTNF- α (20 ng/ml) で刺激した. A: AQP5のWestern blot, B: TNF- α 添加3時間の培養上清中のKC分泌量 (ELISA). C: TNF- α 添加1時間のKC mRNA発現量 (real-time PCR).

Mean \pm SE (n=4), **: p<0.01 vs. vehicle transfected with empty vector.

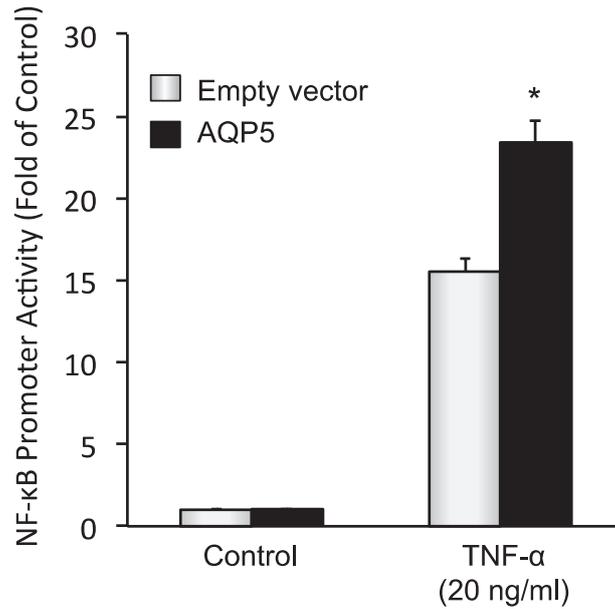


図 6. TNF- α で誘発した NH-3T3 細胞の NF- κ B の活性化に対する AQP5 高発現の作用
 NIH-3T3 細胞に AQP5 遺伝子および NF- κ B 依存性レポーター遺伝子を導入し, 24 時間後に TNF- α (20 ng/ml) を添加して 6 時間培養した. NF- κ B 活性はルシフェラーゼアッセイにより測定した. Mean \pm SE (n=4), *: p<0.05 vs. empty vector transfected.

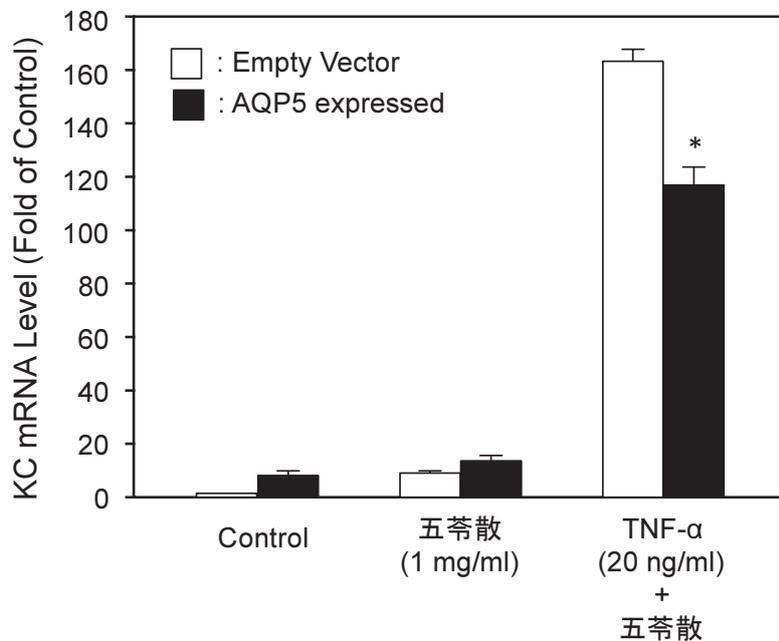


図 7. AQP5 の高発現により亢進した TNF- α 誘発 KC mRNA 発現に対する五苓散の作用
 NIH-3T3 細胞に AQP5 遺伝子を導入し 24 時間後に, 五苓散を含む培養液に交換, その 3 時間後に TNF- α (20 ng/ml) を加え 1 時間後に RNA を抽出した. KC mRNA 発現量は real-time PCR にて測定した. Mean \pm SE (n=4), *: p<0.05 vs. empty vector transfected.

上述のように、五苓散が AQP 活性を抑制することは既に明らかにしている。そこで、AQP5 によるサイトカイン産生亢進に対する五苓散の作用を調べた。NIH-3T3 細胞に AQP5 遺伝子を導入して 24 時間培養し、AQP5 を発現させた細胞を五苓散 (1 mg/ml) を含む培養液で 3 時間前培養し、その後、TNF- α (20 ng/ml) で刺激した。すると、五苓散で前処理した細胞の KC mRNA 発現は、コントロール細胞に比べ有意な低値を示した (図 7)。同様の実験をこれまでに AQP による水透過の阻害作用が報告されている tetraethylammonium (TEA) を用いて行ったが、TEA は五苓散と異なり KC 発現の抑制作用を示さなかった。従って、五苓散によるサイトカイン発現の抑制作用には、水の移動の抑制作用には依存せず、他の機序に基づくと推定された。

■結論

東洋医学において気、血および水は、生体を構成する基本的 3 要素と考えられているが、これらはそれぞれ独立したものではなく、それぞれの因子の変調は他の因子にも影響すると考えられている。我々は AQP が東洋医学的な水の概念を考える上での鍵となる分子と捉え、AQP の種々の機能似対する和漢薬および生薬の作用を追求している。本研究では、まず、種々の皮膚疾患の治療に用いられる和漢薬方剤に含まれる荊芥が、AQP3 の発現亢進作用をもつことを見出した。本作用は、皮膚の保湿作用に繋がるばかりでなく、ケラチノサイトの遊走能を高め、創傷の治癒促進効果を生じることが示唆された。これを裏付けるように、荊芥エキスを塗布した *in vivo* の実験的創傷はコントロールに比べ著明に早く縮小することも分った。さらに、AQP5 については炎症応答反応に重要なサイトカイン発現に対する亢進作用があることが新たに明らかとなり、本作用は代表的な利尿剤である五苓散によって一部抑制されることが分った。これらの成績は、AQP 類の新たな生物学的意義の一部を明らかとするとともに、AQP の機能や発現を調節する種々の和漢薬が、単に生体内の水代謝の調節作用のみならず、組織の修復や免疫応答に影響することを示す興味深い知見である。