

ラット口腔粘膜における水チャンネルAquaporinの局在

伊東博司 杉浦淳子 櫻井裕子

横手優介 山崎 章

Localization of Aquaporins in Rat Oral Mucosa

Hiroshi ITO, Junko SUGIURA, Yuuko SAKURAI

Yuhsuke YOKOTE and Akira YAMASAKI

The expression and localization of water channels, aquaporin (AQP)1 and AQP3, in rat oral mucosa were examined by means of immunohistochemistry. AQP1 was exclusively expressed in the capillary endothelial cells in the lamina propria, whereas the expression of AQP3 was recognized on the keratinocyte plasma membrane at the basal to prickle cell layer. It is considered that AQP3 is responsible for the hydration of the oral epithelium exposed to the environment of possible water loss and that AQP1 plays a role in providing water to them from subepithelial blood vessels.

On the other hand, the junctional epithelium did not express AQP3, which was probably associated with sulcular fluid efflux. The aggregation of AQP-positive blood vessels just beneath the junctional epithelium seems to contribute to the generation of such an environment.

Key words : aquaporins, oral mucosa, immunohistochemistry

緒 言

生命現象において必須の物質である水の代謝を担う一連の構造、すなわち水チャンネルが細胞膜に存在することが近年明らかにされた。これらは遺伝子ファミリーを形成しており、統一名称としてアクアポリンaquaporin (AQP) が提唱された。ヒトにおいては現在10種以上のAQPの存在が確認され、それぞれ機能的特性を有していることが明らかにされている。

アクアポリン1 (AQP1) は最初にヒト赤血球で同定された分子量28kDaの糖タンパクで¹⁾、その後の研究で腎尿細管上皮、脈絡叢、脈絡膜など水の輸送に関わっている器官や血管内皮およびその他の上皮組織で発現することが示されてい

る²⁻⁴⁾。アクアポリン3 (AQP3) は腎、脳、気管、大腸、膀胱、表皮での発現が認められており⁵⁻⁷⁾、水だけでなくグリセリンや尿素などの小分子も通過させることができるとされている。しかしながら、いずれにおいても生理的役割や病態生理については未だ不明な点が多く、口腔領域での検索はほとんど行われていない。そこで本研究では、ラット口腔粘膜でのAQP1およびAQP3の発現について免疫組織化学的に検討した。

材料と方法

1. 標本作製

材料として35週齢雄性Fisherラット (チャールスリバー、厚木) を用いた。奥羽大学実験動物施設にてラット・マウス用通常飼料 (オリエンタル、

東京)と水道水を与えて飼育した。ペントバルビタールナトリウムによる全身麻酔下、舌、歯肉、頬、および口蓋の各粘膜を採取した。採取された組織は直ちにメタカルノア液で3時間固定した後、エタノール、キシレンに浸漬しパラフィンに包埋した。包埋試料より厚さ4 μ mの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を行うとともに免疫組織化学に供した。

2. 免疫組織化学

キシレンによる脱パラフィン、下降エタノールによる親水化を行った後、切片をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浸漬した。スライドガラス上で切片に10%正常ヤギ血清(ニチレイ、東京)を10分間作用させた後、一次抗体として抗AQP1および抗AQP3ウサギ抗体(CEMICON社、米国)との反応を3時間行った。PBSで洗浄した後、切片に二次抗体としてヤギ由来ビオチン化抗ウサギ抗体を30分間作用させた。次いで、PBS洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイ、東京)を10分間作用させ、トリス緩衝生理食塩水(TBS)での洗浄を経て、ニューフクシン液によるアルカリホスファターゼ結合部位の可視化を行った。以上の反応はすべて室温で行った。なおネガティブコントロールとして一次抗体の代わりにPBSを作用させた切片を用いた。

結 果

1. AQP1の発現

頬、舌、口蓋、歯肉のいずれにおいても、抗AQP1抗体に対する陽性反応は血管内皮細胞と赤血球にのみ認められた(図1)。内皮細胞では、内腔側および基底側の細胞表面が強くAQP1を発現した。接合上皮直下を除き粘膜の部位による反応あるいは分布の違いは認められなかったが、接合上皮直下にAQP1陽性毛細血管が密集しているのが観察された(図3b)。

2. AQP3の発現

頬、舌、口蓋、歯肉に共通して、抗AQP3抗体に対する強い陽性反応が重層扁平上皮基底層および有棘層のケラチノサイト細胞膜上に認められた(図2)。一部の基底層および上基底層では細

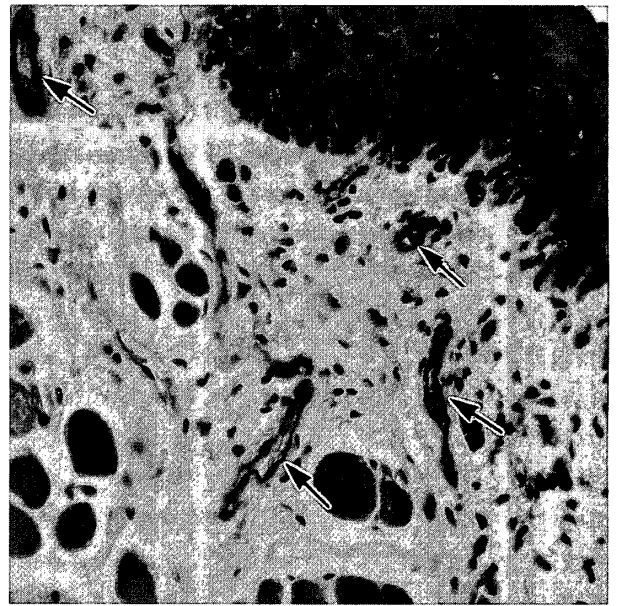


図1 AQP1の発現

頬粘膜固有層にAQP1を発現する毛細血管(矢印)が認められる(×800)

胞表面に加え細胞質内で顆粒状を呈する反応が観察された(図2c)。角化層はまったく反応を示さなかった。歯肉接合上皮は全層にわたってAQP3発現を示さなかった(図3a)。

考 察

ラット口腔粘膜では、AQP1は粘膜固有層の血管内皮細胞に限局して認められ、被覆上皮ケラチノサイトは発現を示さなかった。AQP1は、腎尿細管上皮では内腔面および側方、基底面に存在するところから、この部の重要な機能である水の再吸収に際し、細胞内を通過する経路の存在を示すものと考えられている⁸⁾。一方、体外から体内への主な水の取り入れ口である小腸および大腸では、AQP1は固有層内のリンパ管で強い発現を示すが、粘膜上皮でのAQP1の発現は認められていない⁹⁾。このことは同部での水の移動が細胞内経路ではなく細胞間経路で行われていることを示すものと解されている。また、本研究での口腔粘膜同様、食道や皮膚の重層扁平上皮⁷⁾や呼吸器上皮¹⁰⁾においてもAQP1の発現は確認されておらず、代わってAQP3の発現がみられている。腎あるいは腸管と異なり、水の移動に対するこれらの上皮組織の対応は受動的である。したがって、

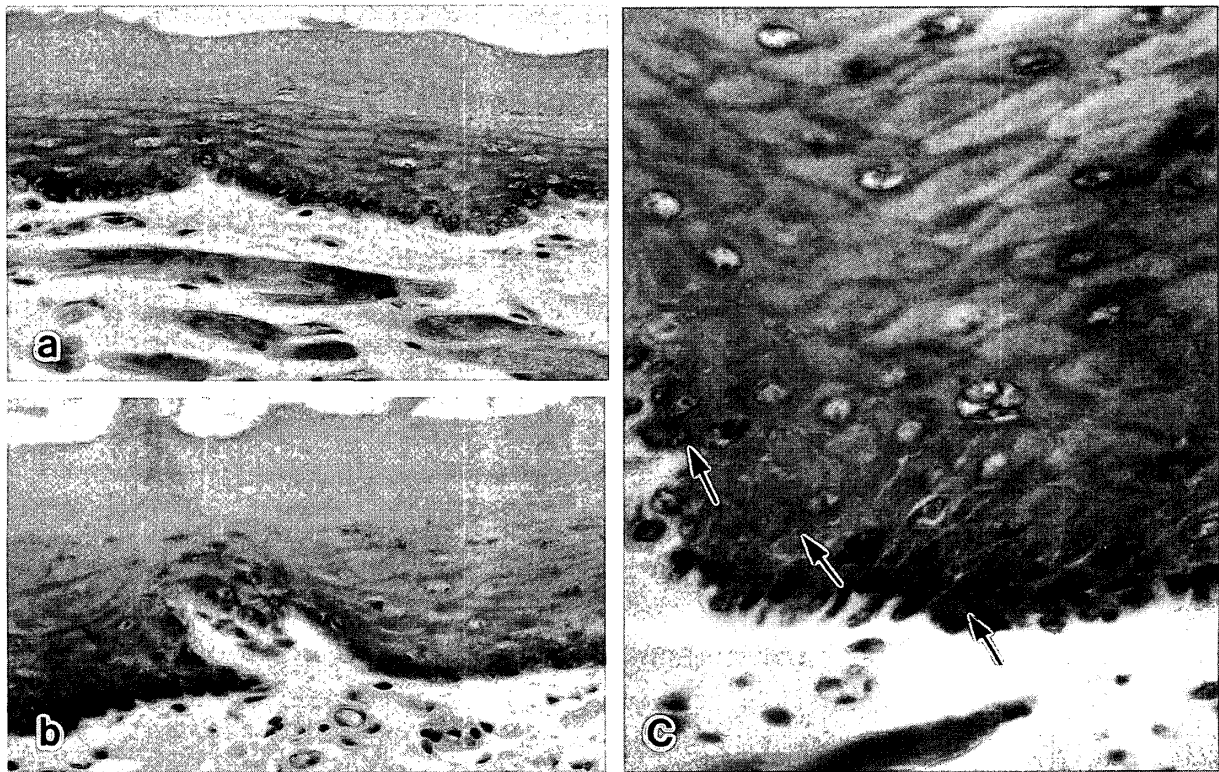


図2 AQP3の発現

頬粘膜(a)および舌粘膜(b)の上皮基底層および有棘層にAQP3の発現が認められる。

AQP3はケラチノサイトの細胞膜上に発現しているが、一部は細胞質内にも発現している(c, 矢印)

(a, b; ×800, c; ×1,600)

これらのことから、細胞の機能および置かれた環境によって異なったタイプの水チャンネルが出現することがうかがわれる。

ラット口腔粘膜では、AQP3は被覆上皮の基底層から有棘層にかけてケラチノサイトが強い発現を示したが、角化層および粘膜固有層ではまったく発現を示さなかった。この所見は皮膚⁷⁾や食道⁹⁾の重層扁平上皮での所見にほぼ一致している。重層扁平上皮は外界に直接面し、外界からの様々な有害因子侵入を防ぐとともに外界への水分の流失を制御している。Matsuzakiら⁶⁾は、AQP3の発現が、表皮などの外皮に加え、尿の高浸透圧に曝される膀胱移行上皮にみられることや、水分の吸収の大部分を担う小腸よりも大腸においてより強いことから、AQP3は水分が失われやすい環境下にある細胞において、細胞内浸透圧と細胞の容量を保持するための水の確保を担っていると考えている。またSougratら⁷⁾は、ヒト表皮におよび人工表皮において角化層下部有棘層がAQP3



図3 a; 接合上皮(*)でのAQP3発現の欠如 (×800)
b; 接合上皮直下でのAQP1発現(矢印) (×1,600)

を介した水の高い透過性を有することを証明し、AQP 3 が組織の保水に役割を演じていることを報告している。したがって、口腔粘膜上皮におけるAQP 3 の役割も表皮同様水分の喪失に対応して細胞環境を保全することにあると考えられる。上皮下毛細血管でのAQP 1 発現はそのための水分供給に役割を演じていると思われる。なお、基底細胞でのAQP 3 細胞質内発現はタンパク合成の早期段階を示すと考えられている⁷⁾。

本研究において接合上皮は全くAQP 3 の発現を示さなかった。隣接する歯肉上皮は他部口腔粘膜上皮同様基底層から有棘層全層にかけて明確なAQP 3 発現を示していたので、染色技法上の問題でないことは明らかである。接合上皮は他部口腔粘膜上皮同様重層扁平上皮よりなるが、構造的にはかなり異なっている。角化層を欠き、細胞間が広く透過性閥門を有しない。一方、常に歯肉固有層から歯肉溝に向かって接合上皮内を通過する豊富な漿液の滲出、すなわち歯肉溝液の排出が生じており、これによって構造的に脆弱な組織の防御が行われていると考えられている。このような環境が接合上皮においてAQP 3 の発現がみられないことの理由のひとつと考えられる。接合上皮直下に認められたAQP 1 陽性血管の密集はこのような接合上皮の特性を反映したものであろう。因みに鼻咽頭粘膜や気管支粘膜では、固有層から水分の供給を受け表面を湿性に保つために、上皮直下毛細血管や静脈叢が強いAQP 1 発現を示している¹⁰⁾。

結 論

口腔粘膜(舌, 頬, 口蓋, 歯肉)における水チャンネルAQP 1 およびAQP 3 の発現状況を免疫組織化学的に検討した。AQP 1 は粘膜固有層の血管内皮細胞に限局して認められ、AQP 3 は被覆上皮の基底層から有棘層にかけてケラチノサイトが強い発現を示した。AQP 3 は粘膜表面での水分の喪失に対応し上皮の保水性を維持し、AQP 1 はそのための水分を供給する役割を担っているものと考えられる。

一方、接合上皮はAQP 3 の発現を全く示さなかったが、これはおそらく歯肉溝液の滲出と関連

しており、直下のAQP 1 陽性毛細血管の集積はこのことを裏付ける所見と考えられる。

文 献

- 1) Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. and Agre, P. : Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256** ; 385-387 1992.
- 2) Sabolic, I., Valenti, G., Verbavatz, J. M., Van Hoek, A. N. *et al.* : Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am J Physiol* **263** ; C1225-C1233 1992.
- 3) Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I., Agre, P. *et al.* : Distribution of aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **190** ; 7275-7279 1993.
- 4) Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I., Knepper, M. A. *et al.* : CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* **120** ; 371-383 1993.
- 5) Frigeri, A., Gropper, M. A., Umenishi, F., Kawashima, M. *et al.* : Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelia and glandular tissues. *J Cell Sci* **108** ; 2993-3002 1995.
- 6) Matsuzaki, T., Suzuki, T., Koyama, H., Tanaka, S. *et al.* : Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J Histochem Cytochem* **47** ; 1275-1286 1999.
- 7) Sougrat, R., Morand, M., Gondran, C., Barre, R. *et al.* : Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* **118** ; 678-685 2002.
- 8) King, L. S. and Agre, P. : Pathophysiology of the aquaporin water channel. *Annu Rev Physiol* **58** ; 619-648 1996.
- 9) Koyama, Y., Yamamoto, T., Tani, T., Nihei, K. *et al.* : Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol* **276** ; C621-C627 1999.
- 10) Nielsen, S., King, L. S., Christensen, B. M. and Agre, P. : Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol* **273** ; C1549-1561 1997.

著者への連絡先：伊東博司，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病理学講座
Reprint requests : Hiroshi ITO, Department of Oral Pathology, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan