

201413004B

厚生労働科学研究費補助金

難治疾患等克服研究事業

(難治性疾患等実用化研究事業 (腎疾患実用化研究事業))

WNK キナーゼをターゲットとした CKD 進展阻止のための
新規治療薬の開発と最適降圧薬選択法の確立に関する研究

総合研究報告書

研究代表者 内田 信一

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業 (腎疾患実用化研究事業))

WNKキナーゼをターゲットとしたCKD進展阻止のための新規治療薬の
開発と最適降圧薬選択法の確立に関する研究

総合研究報告書

研究代表者 内田 信一

目次

I. 総合研究報告

WNKキナーゼをターゲットとしたCKD進展阻止のための新規治療薬の開発と
最適降圧薬選択法の確立に関する研究 ----- 1

内田 信一（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科腎臓内科学）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 7

III. 研究成果の別刷 -----13

I . 総合研究報告

研究課題：WNKキナーゼをターゲットとしたCKD進展阻止のための新規治療薬の開発と
最適降圧薬選択法の確立に関する研究

課題番号：H24-難治等(腎)-一般-004

研究代表者：所属機関東京医科歯科大学
氏名 内田信一

研究分担者：所属機関東京医科歯科大学
氏名 蘇原映誠

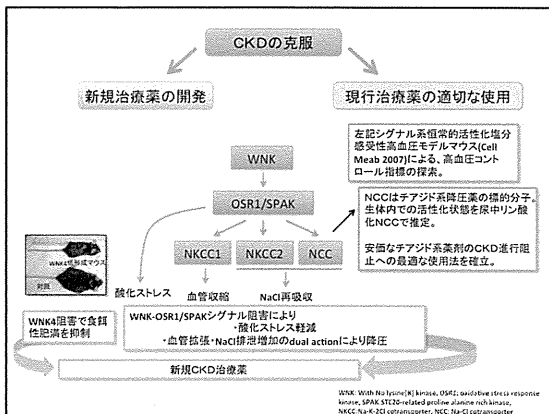
研究要旨

本研究では、1) 新たな作用機序による腎機能改善作用を併せ持つ降圧薬の開発。2) 現役の降圧薬の適切な選択のためのバイオマーカーの開発。3) 血圧コントロールが至適であるかをモニターできるバイオマーカーの開発、を目的とした。その結果、1) 塩分感受性高血圧症の原因遺伝子であるWNKキナーゼシグナル系の阻害薬のseed化合物の同定に成功した。2) また、サイアザイド降圧利尿薬の標的分子であるNaCl共輸送体の尿中エクソソームへの排泄を定量できるELISA系を確立し、サイアザイド感受性および塩分感受性を診断する有用なツールを生み出した。また、この検査により、遺伝子検査をせずともギッテルマン症候群、偽性低アルドステロン症II型を診断できることも明らかとなった。3) 塩分摂取状況や高血圧状態をモニター出来る可能性のあるバイオマーカーの候補を同定できた。

A 研究目的

慢性腎臓病（CKD）患者は、メタボリック症候群や糖尿病といった生活習慣病患者の増加や高齢者の増加により、今後もさらに増加する事が予想される。末期腎不全になれば、透析などの腎代替療法が必要となり、医療費の観点からも、CKDの進展阻止は重要かつ喫緊の課題である。

CKDの進展阻止の重要な方策の一つが血圧の良好なコントロールであることは論を待たないが、CKDの進展阻止のみならず改善をめざす事が可能な薬剤が求められている。よって本研究では、1) 新たな作用機序による腎機能改善作用を併せ持つ降圧薬の開発をめざす。並行して2) 現役の降圧薬の適切な選択のためのバイオマーカーの開発。さらに3) 血圧コントロールが至適であるかをモニターできるバイオマーカーの開発を行う。



B 研究方法

我々は遺伝性の塩分感受性高血圧症の病

態を世界に先駆けて解明し、血圧を制御する新たなリン酸化刺激伝導系（WNKキナーゼ-OSR1/SPAKキナーゼ系）を発見した（Cell Metab 2007）。現在までの我々の研究成果で、本シグナル系の阻害は、強力な塩分排泄作用・血管拡張作用を示し、またこの系はメタボリックシンドロームのような高インスリン状態で活性化していることも判明し、CKDの原因として増加中のこのような患者群に効果的に働く薬剤となる。さらに最近未発表ながら、WNK阻害には抗肥満作用および抗酸化ストレス作用があることも判明した。バルドキシロンによる糖尿病性腎症の改善効果の報告（NEJM 2011）にみられる様に、酸化ストレスを制御することでCKDの改善も可能となってきており、これらの特徴から本シグナル系阻害薬は現代のCKD患者にとって理想的なCKD治療薬となる可能性が浮上した。1) についてはケミカルライブラリースクリーニングを行い、WNKシグナル伝達系阻害薬を探索する。2) については、この系で制御される腎臓のNaCl共輸送体（NCC）のリン酸化体を尿中で定量するELISAの系を確立し、生体内のNCC活性をモニターする方策として有用かを検討する。このことはNCC阻害薬であるチアジド系降圧薬の効果予測することにつながる。3) では我々がもつ塩分感受性高血圧モデルマウスを活用し、塩分ストレス下で、種々の臓器検体において最新の網羅的解析を行い、塩分ストレスのマーカーおよび血圧コントロールのバイオマーカーを探索する。

（倫理面への配慮）本研究のうち、ヒト尿中のNCCならびにリン酸化NCCを測定する部分は、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を得ている。動物実験使

用（遺伝子組み換え生物を含む）に関しては、東京医科歯科大学動物実験委員会にて動物実験計画書の承認を得ており、動物愛護の精神に則り適正に施行する。

C 研究結果

1) WNKシグナル伝達阻害薬のケミカルライブラリースクリーニング

目的に到達するために以下の2つの方策を立案した。

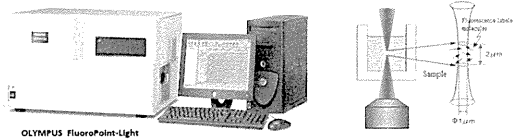
a) WNKの基質であるSPAKキナーゼへのシグナル伝達が、両者の特異的結合によって行われていることに注目し、両者の結合を阻害する化合物をスクリーニングした。そのために、新たなハイスループットなアッセイ系を確立した。蛍光相関分光法という方法を用いて、2分子（この場合はWNKとSPAK）の結合を384wellのプレートで確認でき、そこに約2万種のケミカルライブラリーの化合物を添加して、結合阻害物質を探索した。その結果、2種のseed化合物が得られ、培養細胞系で下流の輸送体蛋白のリン酸化を阻害することが確認され、このストラテジーが機能する事が確認された。現在は、

動物レベルでの効果を得るべく、毒性の軽減と効果の増加を狙って、誘導体展開を行っている。

b) SPAK直接阻害薬の探索を並行して行った。キナーゼ阻害薬は、多くがATP結合部位への競合をその作用機序としていることから、各種キナーゼ特異的な薬剤の開発は困難を極めることが多いとされている。そこで、Aで示したような方策を並行して行ったわけであるが、通常キナーゼ阻害薬探索も行った。WNKでなくSPAKをターゲットとした理由は、WNKは1から4までアイソフォームが有り、そのキナーゼドメインはほぼ同一のアミノ酸配列を持つ。よってWNK全てに非特異的に作用する薬剤となる可能性は高く、WNK1のノックアウトマウスが致死である事を考慮し、下流のSPAKはノックアウトマウスが致死でなく、実際に血圧低下を示したことから、より安全なターゲットとして選定した。我々は、SPAKの基質であるNKCC2のリン酸化を特異的に高感度で検出可能な抗体を持っていたため、この抗体を利用したSPAKのNKCC2リン酸化の系をELISAプレート内で構成することに成功し、ここにケミカルライブラリーの化合物を添加することでスクリーニングを行った。東京医科歯科大学のライブラリーのみならず、慶応大学薬学部水島研究室所蔵の既存薬ライブラリーも使用し、毒性面が既にクリアされている既存薬の中にも候補を探索した。

その結果、2種類のseed化合物を得ることができ、一種は既存薬ライブラリーからクロサンテルという駆虫薬が同定された。結果的に、ケミカルライブラリーから同定された化合物も構造はクロサンテルに類似していたが、毒性の面ではクロサンテルが低く、クロサンテルを用いて、動物実験までを行うことができた。急性投与では、血圧

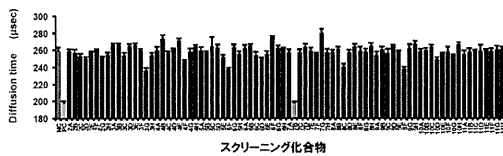
蛍光相関分光法(FCS)



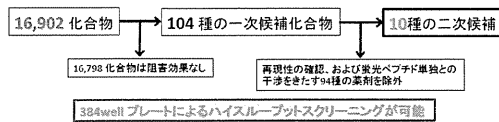
1fLという非常に小さな領域において、蛍光ラベルされたペプチド1分子の揺らぎの速度(並進拡散時間)を測定するもの。

分子量の違いを拡散時間の変化として捉えることができる。

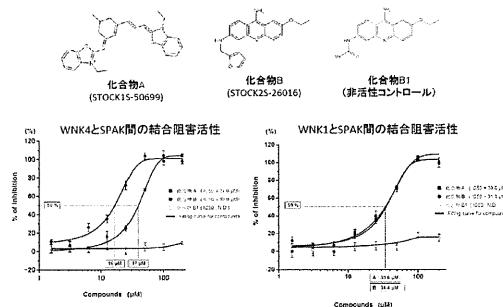
ハイスループットスクリーニングの実験



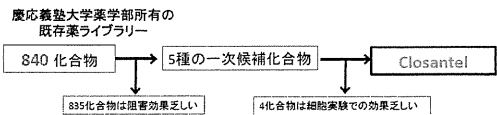
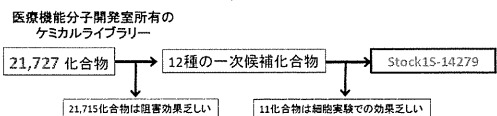
東京医科歯科大学ケミカルバイオロジクススクリーニングセンター所蔵の化合物を添加し、WNK-OSR1/SPAK結合阻害活性を示す化合物スクリーニングを実施した。



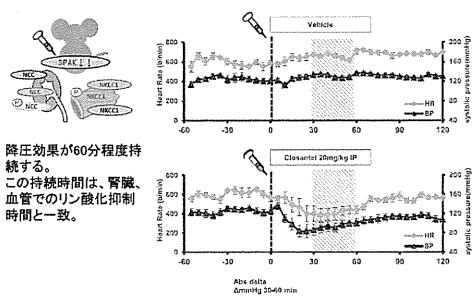
FCSによる結合阻害効果



スクリーニング結果



マウスにおける降圧効果の判定



降圧効果が60分程度持続する。この持続時間は、腎臓、血管でのリン酸化抑制時間と一致。

低下作用を確認でき、血管や腎臓で標的輸送体のリン酸化の低下を確認できた。現在高血圧モデルにて、効果を確認中である。これらSPAK阻害薬は、詳細な検討の結果、ATP非競合性の挙動を示す事が判明し、キナーゼプロファイリングによっても、SPAK特異的な阻害薬である事が確認され、更なる誘導体展開を行っている

2) チアジド系薬剤の標的分子であるNaCl共輸送体 (NCC) の尿中エクソソーム分画での測定

NCCはSPAKによりリン酸化され、遠位尿細管で機能が亢進しNaClを再吸収する。偽性低アルドステロン症II型 (PHAII) や高インスリン血症時の塩分感受性が亢進する機序として、このNCCのリン酸化亢進が原因であることを我々は報告してきた。また、尿細管上皮の輸送体分子は、エクソソームという小胞に乗って、尿中に排出される事が判明してきたが、その意義は不明であった。今回、我々の保有する高感度な抗NCC抗体を用いてELISAの系を立ち上げ、尿中NCC測定が生体内でのNCC活性を反映しているかについて明らかにし、塩分感受性やチアジド薬感受性のバイオマーカーになるかについて検討した。

結果として、高感度に尿中のリン酸体およびトータルNCCを定量する系を立ち上げることができた。動物のPHAIIモデルやヒトPHAII患者では高度にNCC排泄が増加しており、一方NCCの遺伝的欠損よりおこるギッテルマン症候群では尿中NCC排泄は感度以下で、この測定により生体内でのNCC機能評価ができる事が明らかとなった。その後100名程度の一般外来患者で尿中NCCを測定し、腎機能やNa排泄率との相関があるこ

とを確認できた。今後は、チアジド系薬剤の反応性を事前に予測できるかについて検討する予定である。

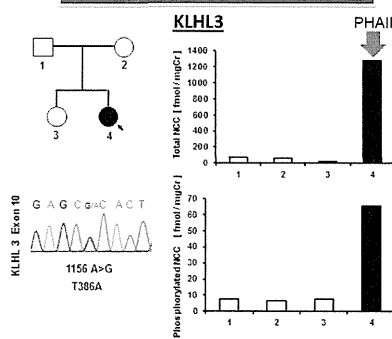
3) 血圧コントロール・塩分負荷をモニター出来るバイオマーカーの探索

我々のPHAIIモデルマウスは、NCCの機能亢進を原因とする塩分感受性高血圧モデルであり、他の高血圧モデルとくらべて純粋に腎臓での塩分排泄障害にもとづいた高血圧モデルである事から、塩分が体にたまった際におこる生命現象を記述するには理想的なモデルである。今回、このモデルにさらに塩分負荷を施した際に起こる変化を遺伝子レベル、蛋白レベル、エピジェネティックレベルで検証した。ここで、まだ記載できる段階にはないが、腎臓内、血液内で塩分負荷に応じて変化する数種の分子を同定し、現在それがバイオマーカーとしての機能を有するかを検討中である。また、血圧・塩分メモリーとしてのエピジェネティックな変化についても、CHIP-Seqの方法にていくつかの候補を得ることができ、今後の検討が必要である。

D 考察

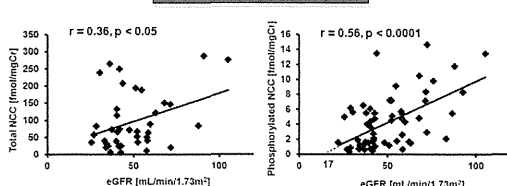
本研究により、まず1) として、WNKシグナル系を阻害するために、WNK-SPAK結合阻害という方策と、SPAKの直接阻害という方策が実際に可能である事がケミカルライブラリースクリーニングによる実際のseed化合物の単離により実証された (Biochemical J 2013, J Am Soc Nephrol 2014)。今後はこのseedをいかにして毒性の軽減や体内動態を考えた薬効の増加を図るかが課題であり、今後の開発研究へつながる成果を得られたと思われる。次に、2) として、チアジド系化合物の標的分子であるNCC輸送体の尿中エクソソームでの定量法を確立でき、腎臓でのNCCの活性評価に使える事を示せたことは、今後NCCのみならず腎臓内での種々の輸送体分子の状態を尿検査で推定できる可能性を示した点で意義がある。チアジド系薬剤の使用指針を本アッセイを用いた臨床試験で今後確立していく。3) として、血圧コントロールや塩分摂取の状況を把握できるようなバイオマーカーの探索を行ったが、現時点で数種の有望な候補が得られている。あくまで臨床応用を念頭に置いて、血液ないし尿という手軽な臨床検体を対象としたため、その候補の探索に時間を要した。現時点で同定した分子名は公表できないが、意外にも腎臓に深く関わりが知られている分子ではなく、むしろ免疫系との関わりが示唆される分子が、塩分負荷に応じて変化する例が多く見られた事は興味深い。今後は、血圧上昇や塩分摂取量に応じてどのようなタイムコースで変化するのを見極め、動物実験をへて、ヒト臨床検査へ向かう。

PHAII家系での尿中NCC排泄量



PHAII患者では、尿中NCCが家族内健康者の約5~10倍に増加していた。

eGFRと尿中NCC排泄



GFRの低下と並行して尿中NCCの低下が認められた。

サイアザイドが有効である患者の腎機能と臨床的によく合致する

これらの成果は、国際的な有名雑誌で論文が採択され、この分野では大きな反響を得た。また、今回開発した2分子間の結合を阻害する化合物のスクリーニング法は、今後のドラッグスクリーニング法に新たな方法論を提示した。

今後の展望としては、研究費や共同研究者を得て、これらseed化合物を元に開発研究に移行したい。また、尿中NCC測定は、さらに臨床データを重ね、チアジド薬感受性予測やギッテルマン症候群や偽性低アルドステロン症II方の標準検査法として確立する予定である。

E 結論

WNKキナーゼをターゲットとした新規治療薬の開発のためのseed化合物を得ることができ、またチアジド系薬剤の感受性検査法となる尿中NCC測定法を確立できた。今後、開発研究を経て実用化にすすみ、その後これらの薬剤が既存の降圧薬に対しCKD進展阻止の観点から優位性があるかどうかについてさらに研究が必要となる。

これらの研究成果は実質2年半で達成されており、担当した大学院生の献身的ともいえるハードワーク無しにはあり得なかったと思われ、ここに感謝の意を表したい。

F 研究発表

1) 国内

口頭発表 44件

それ以外（レビュー等）の発表 11件

そのうち主なもの

論文発表（日本語総説 抜粋）

1. 内田信一. WNK キナーゼによる輸送体制御とその異常. 細胞工学 31:558-564, 2012.
2. 蘇原映誠, 内田信一. インスリンによる Na 再吸収亢進のメカニズム. Annual Review 2013 腎臓 : 11-16, 2013.
3. 蘇原映誠. 【CKD 治療の新たな標的分子】 WNK キナーゼによる塩分調節機構. 腎と透析 74(2) : 225-229, 2013.
4. 若林麻衣, 内田信一. 遺伝性高血圧症の分子機構. Annual Review 2014 循環器 : 208-216, 2013.

学会発表（抜粋）

1. 銭谷慕子, 蘇原映誠, 大井克征, 森山宗子, 須佐紘一郎, 森崇寧, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. マウス血管平滑筋における SPAK および NKCC1 のリン酸化の塩分摂取による制御. 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2012 年 6 月.
2. 飯盛聡一郎, 野田裕美, 岡戸丈和, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. 腎臓内科専門外来の新患 CKD 患者の特徴と心血管疾患既往についての検討. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013

年 5 月.

3. 磯部清志, 蘇原映誠, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. 尿 Exosome 中の total およびリン酸化 NCC のサンドイッチ ELISA 測定系の確立. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月.
 4. 大井克征, 石本育栄, 飯盛聡一郎, 桑名仁, 油井直史, 蘇原映誠, 岡戸丈和, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. 利尿剤負荷試験が有用であった Gitelman 症候群の 1 例. 第 43 回日本腎臓学会東部学術大会, 東京, 2013 年 10 月
 5. 菊池絵梨子, 森崇寧, 磯部清志, 蘇原映誠, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. ELISA 法による化合物ライブラリースクリーニングを用いた新規降圧剤としての SPAK キナーゼ阻害薬の開発. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2013 年 5 月.
 6. 銭谷慕子, 蘇原映誠, 大井克征, 千賀宗子, 須佐紘一郎, 森崇寧, 頼建光, 佐々木成, 内田信一. マウス血管平滑筋における塩分摂取による WNN3-SPAK-NKCC1 カスケードの制御. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月.
 7. 森崇寧, 蘇原映誠, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. 新規降圧薬としての WNK-OSR1/SPAK 複合体形成阻害薬の開発. 第 56 回日本腎臓学会学術集会総会, 東京, 2013 年 6 月.
 8. 森雄太郎, 蘇原映誠, 若林麻衣, 森崇寧, 荒木雄也, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. 偽性低アルドステロン症 II 型を来す KLHL3 変異体の解析. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月.
 9. 油井直史, Hua A. J. Lu, Bouley Richard, 野村尚弘, Brown Dennis, 内田信一, 佐々木成. アクアポリン 2 のトランスサイトシス経路の同定. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月.
 10. 若林麻衣, 森崇寧, 磯部清志, 千賀宗子, 森雄太郎, 松尾浩司, 村田智博, 堅村信介, 蘇原映誠, 頼建光, 内田信一, 佐々木成. KLHL3 を介した WNK4 のユビキチン化障害がヒト遺伝性高血圧症の発症メカニズムである. 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月.
- 2) 海外
- 口頭発表 35件
- 原著論文による発表 41件
- それ以外（レビュー等）の発表 2件
- そのうち主なもの
- 論文発表（抜粋）
1. Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, Alessi DR, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates the WNK-

- OSR1/SPAK-NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice. *Hypertension*. 60:981-90, 2012.
2. Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Does a β 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney? *Nat. Med.* 18:1324-5, 2012.
 3. Iimori S, Noda Y, Okado T, Naito S, Toda T, Chida Y, Kuwahara M, Ando R, Nishio Y, Maeda Y, Tanaka H, Tamura T, Kimoto S, Kanda E, Inoshita S, Yoshikawa M, Okutsu R, Tajima M, Kusaura T, Kobayashi K, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Baseline characteristics and prevalence of cardiovascular disease in newly visiting or referred chronic kidney disease patients to nephrology centers in Japan: a prospective cohort study. *BMC Nephrol.* 14: 152, 2013.
 4. Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305: F1374-81, 2013.
 5. Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem J.* 455: 339-45, 2013.
 6. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. *Cell Rep.* 3: 858-68, 2013.
 7. Yang SS, Fang YW, Tseng MH, Chu PY, Yu IS, Wu HC, Lin SW, Chau T, Uchida S, Sasaki S, Lin YF, Sytwu HK, Lin SH. Phosphorylation regulates NCC stability and transporter activity in vivo. *J Am Soc Nephrol.* 24: 1587-97, 2013.
 8. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. *Hypertension.* 62: 872-878, 2013.
 9. Uchida S. Regulation of blood pressure and renal electrolyte balance by Cullin-RING ligases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 23(5):487-93, 2014.
 10. Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S. Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in an AQP11 Knockout Model. *J Am Soc Nephrol.* 25(12):2789-99, 2014.
 11. Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Nomura N, Nishida H, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeishi K, Takeda N, Sasaki S, Uchida S. Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice. *Hum Mol Genet.* 23(19):5052-60, 2014.
 12. Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4 is the major WNK positively regulating NCC in the mouse kidney. *Biosci Rep.* 9;34(3), 2014.
 13. Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S. Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins. *Biol Cell.* 106(2):45-56, 2014.
 14. Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters. *J Am Soc Nephrol.* 2014 [Epub ahead of print]
 15. Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S. Kelch-like protein 2 mediates angiotensin II-with no lysine 3 signaling in the regulation of vascular tonus. *J Am Soc Nephrol.* 2014 [Epub ahead of print]
- 学会発表 (抜粋)
1. Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Development of sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measurement of urinary total and phosphorylated Na-Clcotransporter (NCC) protein. The 45th Annual meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
 2. Kikuchi E, Mori T, Isobe K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for direct SPAK inhibitors by a newly developed ELISA system. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.

3. Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Generation and analysis of WT-WNK4 transgenic mice revealed the physiological role of WNK4. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
 4. Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK4-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
 5. Zeniya M, Sohara E, Oi K, Chiga M, Susa K, Mori T, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake and angiotensin II regulates WNK-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta. The 45th Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, November, 2012.
 6. Uchida S. Role of WNK kinases in the blood pressure regulation. Taiwan Society of Nephrology 2012, China Medical University, Taichung, Taiwan, December, 2012.
 7. Uchida S. Chemical library screening for drugs to correct intracellular mislocalization of R8L mutant barttin. 2012 International Ion Channel Conference. The New world of anion and cation channels. Jeju, Korea, August, 2012.
 8. Uchida S. Impaired KLHL3/Cullin3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. Frontiers in Renal Disease Research symposium, Ulsan, South Korea, August 23, 2013.
 9. Isobe K, Mori T, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Clinical Significance of Urinary Thiazide-Sensitive Na-Cl Cotransporter (NCC) Measurement by Newly Development Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. The 46th Annual meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 10. Mori T, Eriko K, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Chemical library screening for WNK signaling inhibitors by using fluorescent correlation spectroscopy. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 11. Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Analyses of KLHL3 mutants that cause Pseudohypoaldosteronism type II. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 12. Naito S, Iimori S, Okado T, Noda Y, Rai T, Uchida S, Sasaki S. Evaluation of blood pressure control of chronic kidney disease patients prior to nephrologist care in Japan. 50th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Congress, Istanbul, May, 2013.
 13. Susa K, Sohara E, Zeniya M, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Low salt intake decreased transcription and protein level of KLHL3 in mouse kidney. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 14. Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S. KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 15. Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 activates OSR1 and SPAK kinases-NaCl cotransporter (NCC) signaling and causes hypertension. The 46st Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
 16. Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. WNK3 Regulates Blood Pressure Through the Regulation of Vascular OSR1/SPAK-NKCC1 Phosphorylation Cascade. The 46th Annual Meeting of American Society of Nephrology, Atlanta, November, 2013.
- G 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
- 1 特許取得
なし
 - 2 実用新案登録
なし
 - 3 その他
特になし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hara-Chikuma M, Sugiyama Y, Kabashima K, Sohara E, Uchida S, Sasaki S, Inoue S, Miyachi Y.	Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells.	<i>FASEB J.</i>	26	211-218	2012
Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	425	456-61	2012
Louchami K, Best L, Brown P, Virreira M, Hupkens E, Perret J, Devuyst O, Uchida S, Delporte C, Malaisse WJ, Beauwens R, Sener A.	A new role for aquaporin 7 in insulin secretion.	<i>Cell Physiol. Biochem.</i>	29	65-74	2012
Naguro I, Umeda T, Kobayashi Y, Maruyama J, Hattori K, Shimizu Y, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Uchida S, Vandewalle A, Noguchi T, Nishitoh H, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H.	ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney.	<i>Nat. Commun.</i>	3	1285	2012

Nishida H, Sohara E, Nomura N, Chiga M, AlessiDR, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway activates theWNK-OSR1/SPAK - NCC phosphorylation cascade in hyperinsulinemic db/db mice.	<i>Hypertension.</i>	60	981-90	2012
Ohta E, Akazawa M, Noda Y, Mandai S, Naito S, Ohta A, Sohara E, Okado T, Rai T, Uchida S, Sasaki S.	Severe hyperparathyroidism in a pre-dialysis chronic kidney diseasepatient treated with avery low protein diet.	<i>J. Bone Miner. Metab.</i>	30	238-42	2012
Ohtaki H, Ohara K, Song D, Miyamoto K, Tsumuraya T, Yofu S, Dohi K, Tanabe S, Sasaki S, Uchida S, Matsunaga M, Shioda S.	Accumulation of autofluorescent storage material in brain is accelerated by ischemia in chloride channel 3 gene-deficient mice.	<i>J. Neurosci. Res.</i>	90	2163-72	2012
Oi K, Sohara E, Rai T, Misawa M, Chiga M, AlessiDR, Sasaki S, Uchida S.	A minor role of WNK3 in regulating phosphorylation of renal NKCC2 and NCC co-transporters in vivo.	<i>Biol. Open.</i>	1	120-7	2012
Susa K, Kita S, Iwamoto T, Yang SS, Lin SH, Ohta A, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Alessi DR, Uchida S.	Effect of heterozygousdeletion of WNK1 on the WNK-OSR1/SPAK-N CC/NKCC1/NKCC2 signal cascade in the kidney and blood vessels.	<i>Clin. Exp. Nephrol.</i>	16	530-8	2012
Susa K, SoharaE, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	WNK-OSR1/SPAK- NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	427	743-7	2012
Uchida S, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S.	Does a β 2-adrenergic receptor-WNK4-Na-Cl co-transporter signal cascade exist in the in vivo kidney?	<i>Nat. Med.</i>	18	1324-5	2012

Isobe K, Mori T, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Kumagai N, Kamada F, Morimoto T, Hayashi M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Development of enzyme-linked immunosorbent assays for urinary thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter (NCC) measurement.	<i>Am J Physiol Renal Physiol.</i>	305	F1374-81	2013
Inoue R, Sohara E, Rai T, Satoh T, Yokozeiki H, Sasaki S, Uchida S.	Immunolocalization and translocation of aquaporin-5 water channel in sweat glands.	<i>J. Dermatol Sci.</i>	70	26-33	2013
Mori T, Kikuchi E, Watanabe Y, Fujii S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Chemical library screening for WNK signalling inhibitors using fluorescence correlation spectroscopy.	<i>Biochem J.</i>	29	65-74	2013
Mori Y, Wakabayashi M, Mori T, Araki Y, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Decrease of WNK4 ubiquitination by disease-causing mutations of KLHL3 through different molecular mechanisms.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	439	30-4	2013
Nomura N, Kamiya K, Ikeda K, Yui N, Chiga M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Treatment with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin ameliorated symptoms of Bartter syndrome type caused by mutated <i>Bsnd</i> in mice.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	441	544-9	2013
Sasaki S, Chiga M, Kikuchi E, Rai T, Uchida S.	Hereditary nephrogenic diabetes insipidus in Japanese patients: analysis of 78 families and report of 22 new mutations in AVPR2 and AQP2.	<i>Clin Exp Nephrol.</i>	17	338-344	2013

Takahashi D, Mori T, Wakabayashi M, Mori Y, Susa K, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	KLHL2 interacts with and ubiquitinates WNK kinases.	<i>Biochem Biophys Res Commun.</i>	437	457-62	2013
Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension.	<i>Cell Rep.</i>	3	858-68	2013
Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II.	<i>Hypertension</i>	62	872-8	2013
Inoue Y, Sohara E, Kobayashi K, Chiga M, Rai T, Ishibashi K, Horie S, Su X, Zhou J, Sasaki S, Uchida S.	Aberrant glycosylation and localization of polycystin-1 cause polycystic kidney in an AQP11 knockout model.	<i>J Am Soc Nephrol</i>	25	2789-99	2014
Susa K, Sohara E, Rai T, Zeniya M, Mori Y, Mori T, Chiga M, Nomura N, Nishida H, Takahashi D, Isobe K, Inoue Y, Takeishi K, Takeda N, Sasaki S, Uchida S.	Impaired degradation of WNK1 and WNK4 kinases causes PHAII in mutant KLHL3 knock-in mice.	<i>Hum Mol Genet.</i>	23	5052-60	2014

Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S.	WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney.	<i>Biosci Rep.</i>	34	195-205	2014
Uchida S, Sohara E, Rai T, Sasaki S.	Regulation of with-no-lysine kinase signaling by Kelch-like proteins.	<i>Biol Cell.</i>	106	45-56	2014
Uchida S.	Regulation of blood pressure and renal electrolyte balance by Cullin-RING ligases.	<i>Curr Opin Nephrol Hypertens.</i>	23	487-493	2014
Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S.	Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters.	<i>J Am Soc Nephrol</i>	Epub ahead of print		2015
Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S.	Kelch-like protein 2 mediates angiotensin II-with no lysine 3 signaling in the regulation of vascular tonus	<i>J Am Soc Nephrol</i>	Epub ahead of print		2015

Ⅲ. 研究成果の別刷

Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells

Mariko Hara-Chikuma,^{*,†,1} Yoshinori Sugiyama,[†] Kenji Kabashima,^{*} Eisei Sohara,[‡] Shinichi Uchida,[‡] Sei Sasaki,[‡] Shintaro Inoue,[†] and Yoshiki Miyachi^{*}

^{*}Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan;

[†]Innovative Beauty Science Laboratory, Kanebo Cosmetics Inc., Odawara, Japan; and [‡]Department of Nephrology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

ABSTRACT Dendritic cells (DCs) have the ability to present antigen and play a critical role in the induction of the acquired immune response. Skin DCs uptake antigen and subsequently migrate to regional draining lymph nodes (LNs), where they activate naive T cells. Here we show that the water/glycerol channel protein aquaporin 7 (AQP7) is expressed on epidermal and dermal DCs and involved in the initiation of primary immune responses. AQP7-deficient DCs showed a decreased cellular uptake of low-molecular-mass compounds (fluorescein isothiocyanate and Lucifer yellow) and high-molecular-mass substances (ovalbumin and dextran), suggesting that AQP7 is involved in antigen uptake. AQP7-deficient DCs also exhibited reduced chemokine-dependent cell migration in comparison to wild-type DCs. Consistent with these *in vitro* results, AQP7-deficient mice demonstrated a reduced accumulation of antigen-retaining DCs in the LNs after antigen application to the skin, which could be attributed to decreased antigen uptake and migration. Coincidentally, AQP7-deficient mice had impaired antigen-induced sensitization in a contact hypersensitivity model. These observations suggested that AQP7 in skin DCs is primarily involved in antigen uptake and in the subsequent migration of DCs and is responsible for antigen presentation and the promotion of downstream immune responses.—Hara-Chikuma, M., Sugiyama, Y., Kabashima, K., Sohara, E., Uchida, S., Sasaki, S., Inoue, S., Miyachi, Y. Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. *FASEB J.* 26, 211–218 (2012). www.fasebj.org

Key Words: *macropinocytosis • phagocytosis • chemotaxis*

THE SKIN PROVIDES A PERMEABILITY barrier and a highly refined system of immune surveillance to protect the body against unwanted substances, such as infectious agents, pathogens, or antigens from the environment. The immune system of the skin relies on a rich network of antigen-presenting dendritic cells (DCs) that localize in the epidermis and the dermis. Cur-

rently, skin DCs are divided into 3 subsets: epidermal Langerhans cells (LCs) and Langerin⁺ or Langerin⁻ dermal DCs (dDCs) (1, 2). DCs residing in the skin capture foreign antigens or pathogens, then mature and migrate to draining lymph nodes (LNs), where they present antigen to naive T cells and initiate immune responses (3–5). Immature DCs can constitutively uptake antigens by several pathways, such as macropinocytosis of soluble antigens; phagocytosis of particles, including viruses and bacteria; and receptor-mediated endocytosis (6, 7). Although the relative contributions of LCs or dDCs in antigen capture and processing remain undefined (8, 9), both are presumed to have key roles in eliciting cutaneous immune responses.

Aquaporins (AQPs) are integral membrane channel proteins that form a barrel-like structure surrounding pores, allowing the transport of water and other small solutes. To date, 13 AQPs (named AQP0–12) have been identified in mammals, and these are classified into 3 major subtypes according to their transport capabilities: water-selective AQPs (AQPs 1, 2, 4, and 5); aquaglyceroporins that transport water and possibly other small solutes, such as glycerol (AQPs 3, 7, 9, and 10); and unorthodox AQPs (AQPs 6, 8, 11, and 12) (10–12). The selectivity of the AQPs results both from a steric mechanism because of the pore size and from specific amino acid substitutions that regulate the preference for a hydrophobic or hydrophilic substrate (13, 14). Numerous studies have revealed the potential roles of AQPs in several organs and their functions, for example, AQPs 1–3 in the urinary concentrating system (15), AQP1 in angiogenesis (16), AQP3 in tumorigenesis (17), and AQP4 in neuromyelitis optica and brain edema (18, 19).

With regard to expression of AQPs in DCs, some

¹ Correspondence: Center for Innovation in Immunoregulative Technology and Therapeutics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. E-mail: haramari@kuhp.kyoto-u.ac.jp
doi: 10.1096/fj.11-186627

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

AQPs have been identified in DCs, including AQP3, 5, 7, and 9 in human DCs generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (20, 21) and AQP5 in mice bone marrow monocyte-derived DCs (BMDCs) (22). Moreover, our preliminary experiment found that AQP3 and 7 were expressed in mice skin DCs. The study using AQP inhibitors in human PBMC-derived DCs suggested that AQPs might play a role in the process of antigen uptake *via* fluid phase macropinocytosis (20). The experiment on AQP5-knockout mice showed the decrease in endocytotic ability in AQP5-deficient BMDCs (22). These previous studies suggested the involvement of AQPs in antigen uptake in monocyte-derived DCs; however, a functional characterization of specific AQPs in cutaneous DCs has not yet been elucidated.

This study focuses on the role of AQP7 in skin DCs because another study from our laboratory found that AQP3 expression had little effect on DC function (unpublished results). We tested the hypothesis that AQP7 is involved in macropinocytosis and/or phagocytosis, specifically antigen uptake, which is required for antigen-induced cutaneous immune responses. For these studies, we utilized AQP7-deficient mice (23) and isolated LCs and dDCs from mouse skin. We found that AQP7 is functionally expressed in mouse skin DCs and is involved in antigen uptake, cell migration, and the subsequent initiation of an immune reaction. Our data suggest that AQP7 may play an important role in allergy induction and immune surveillance in the skin and in other tissues in which DCs are localized.

MATERIALS AND METHODS

Mice

AQP7-knockout (AQP7^{-/-}) mice (C57BL/6 genetic background) were generated by targeted gene disruption (23). All animal experiments were approved by the Committee on Animal Research of Kyoto University.

Cutaneous cell preparation and cultures

Skin was incubated with dispase (5 U/ml; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) for 1 h at 37°C to separate the dermis and epidermis. The epidermis was incubated in enzyme-free cell dissociation buffer (20 min, 37°C; Millipore, Bedford, MA, USA) to isolate single cells. The dermis was incubated in collagenase type II (500 U/ml; Worthington Biochemicals, Lakewood, NJ, USA) for 1 h at 37°C. All solutions were dissolved in complete RPMI (cRPMI) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 100 μ M nonessential amino acids, and 10 μ M sodium pyruvate (Invitrogen).

Quantitative RT-PCR

CD11c⁺ cells were isolated from epidermal or dermal cell suspensions using CD11c microbeads with the AutoMACS system (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) per the manufacturer's protocol. Total RNA was extracted using TRIzol

(Invitrogen). The cDNA was reverse transcribed from total RNA samples using the Prime Script RT reagent kit (Takara Bio, Otsu, Japan). Quantitative RT-PCR was performed using SYBR Green I (Takara Bio) and the Light Cycler real-time PCR apparatus (Roche, Mannheim, Germany).

Immunofluorescence

The isolated LCs were cultured on polylysine-coated coverslips and were fixed with 4% formalin in PBS. Cells were permeabilized with 0.1% saponin and stained with anti-AQP7 (AB15568; Millipore) and a FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen).

Flow cytometry analysis

To determine AQP7 expression, single-cell suspensions were stained with monoclonal antibodies (Abs) against CD11c, MHC class II, and EpCAM (eBioscience, San Diego, CA, USA) and were fixed in 4% formalin. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and incubated with anti-AQP7 (Millipore) and a FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen). The samples were analyzed using a Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). For the analysis of DCs, cell suspensions were stained with antibodies recognizing CD11c, MHC class II, EpCAM, CD80, CD86, CCR7, and CXCR4 (eBioscience). Information regarding antibodies is available in Supplemental Table S1.

Macropinocytosis and phagocytosis assay

Freshly isolated epidermal or dermal cell suspensions were incubated in cRPMI for 1 h, followed with a Lucifer yellow CH potassium salt (LY, 0.1 mg/ml; Sigma), fluorescein isothiocyanate (FITC; 0.1–1 mg/ml; Invitrogen), FITC-dextran (molecular mass ~4, 40, 250 kDa, 0.5 mg/ml; Sigma), or FITC-ovalbumin (FITC-OVA; 0.25 mg/ml; Invitrogen) in cRPMI for 45 min (37°C, 5% CO₂). The cells were washed 4 times with cold PBS containing 1% BSA, stained with anti-MHC class II, and analyzed on a flow cytometer.

Water and glycerol permeability of LCs

Water and glycerol permeability were measured using a SX20 stopped-flow spectrometer (Applied Photophysics, Surrey, UK). Isolated LCs in RPMI medium (1 \times 10⁶ cells/ μ l) were subjected to a 150 mM inwardly directed mannitol or glycerol gradient at 22°C. Water uptake was measured by the kinetics of the decrease in cell volume, as measured by the 90° scattered light intensity at a wavelength of 450 nm, over the time course (24, 25). Glycerol uptake was estimated by a single exponential fit on the second part of the curve, as described previously (26). Reciprocal exponential time constants (τ^{-1}) were calculated.

Chemotaxis assay

Epidermal or dermal cell suspensions (10⁶ cell/100 μ l) were deposited into the upper chamber of a polycarbonate transwell membrane filter (5 μ m pore size; Corning Costar, Cambridge, MA, USA). The lower chamber contained CXCL12 (100 ng/ml) or CCL21 (100 ng/ml) in cRPMI medium. After incubation for 3 h at 37°C, the recovered cells were analyzed using flow cytometry.

Contact hypersensitivity

Mice were sensitized by application of 20 μ l of 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB; 0.5%) solution on the abdomen. After 5 d, 20 μ l of DNFB (0.3%) was applied to the left ear, and the vehicle (acetone/olive oil, 4:1) was applied to the right ear. Ear swelling was measured with a thickness gauge (Teclok, Nagano, Japan) at 24 h after challenge.

DNFB-dependent cell proliferation and cytokine production were examined with cells (5×10^5) isolated from the axillary and inguinal LNs at 5 d after sensitization. The LN cells were cultured in the absence or presence of trinitrochlorobenzene (TNCB; 50 μ g/ml) for 3 d, pulsed with 0.5 μ Ci [3 H]-thymidine for 24 h, and subjected to liquid scintillation counting. IFN- γ release into the culture supernatant during the entire 3-d period was determined using an ELISA kit (eBioscience).

For the adoptive transfer, cell suspensions obtained from the LNs of DNFB-sensitized mice were injected subcutaneously (2×10^5 cells/20 μ l PBS) into the ears of naive WT mice. The ears were immediately challenged by applying 20 μ l of 0.3% DNFB or vehicle to either side of the ear. Ear thickness was measured after 24 h.

Antigen-induced cutaneous DC migration

Mice were painted with 200 μ l FITC (10 mg/ml in acetone and dibutyl phthalate, 1:1; Invitrogen) or 100 μ l FITC-OVA (2 mg/ml in 50% ethanol; Invitrogen), and the number of migrated cutaneous DCs in the draining LNs was analyzed by flow cytometry. Before application of FITC-OVA, the stratum corneum was removed by tape stripping (3 or 10 times) to disrupt the skin permeability barrier, and the transepidermal water loss (TEWL) value was monitored with a Tewameter Vapo Scan (Asahi Biomed, Tokyo, Japan) as an index of barrier function (Asahi Biomed, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a 2-tailed Student's *t* test or ANOVA.

RESULTS

AQP7 expression in mouse cutaneous DCs

To characterize the expression of AQP7 in cutaneous DCs, we analyzed AQP7 expression levels in mouse DCs, including epidermal LCs and dermal DCs (dDCs). The epidermis and dermis were separated by dispase treatment and digested into single-cell suspensions by an enzyme-free cell dissociation buffer or collagenase treatment, respectively. CD11c $^+$ cells were selected by AutoMACS bead separation from freshly isolated, functionally immature cells, and we analyzed AQP7 mRNA levels by quantitative real-time RT-PCR. An AQP7 transcript was identified in both LCs and dDCs as well as in CD4 $^+$ T cells (Fig. 1A). We also found that AQP3 was expressed in LCs and dDCs, while we did not identify AQP5 and AQP9 expression in skin DCs, implying that skin DCs might have different expression patterns of AQPs from BMDCs (Supplemental Fig. S1).

Using a germline AQP7 $^{-/-}$ mouse as a control (23), we verified the expression of AQP7 protein in MHC class II $^+$ CD11c $^+$ EpCAM $^+$ LC populations from the epidermal cell suspension by flow cytometry analysis (Fig. 1B). Immunofluorescence microscopy showed that AQP7 was mainly localized on the plasma membrane of CD11c $^+$ LCs (Fig. 1C).

To examine the function of AQP7 in the development of skin DCs, we analyzed the cell density and size of DCs isolated from the epidermis and dermis. We observed comparable cell numbers and cell size between wild-type (WT) and AQP7 $^{-/-}$ mice, indicating that AQP7 deficiency does not affect the generation of LCs or dDCs (Fig. 1D).

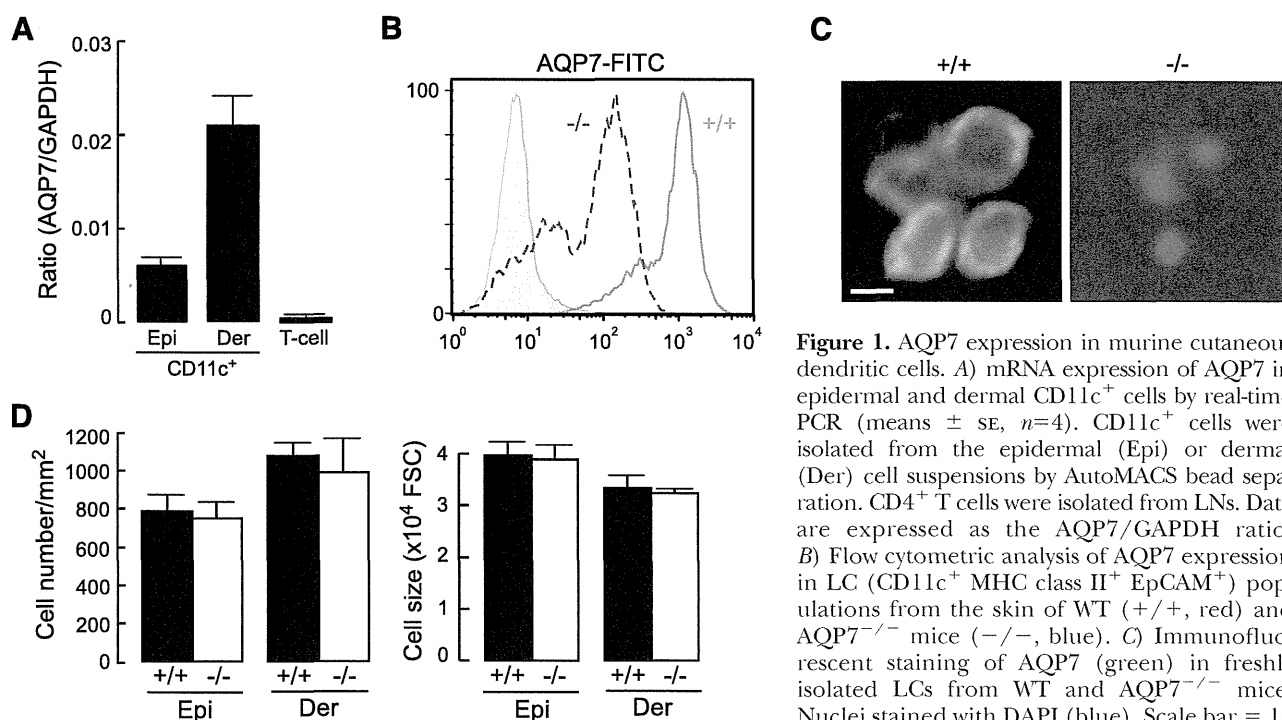


Figure 1. AQP7 expression in murine cutaneous dendritic cells. *A*) mRNA expression of AQP7 in epidermal and dermal CD11c $^+$ cells by real-time PCR (means \pm SE, $n=4$). CD11c $^+$ cells were isolated from the epidermal (Epi) or dermal (Der) cell suspensions by AutoMACS bead separation. CD4 $^+$ T cells were isolated from LNs. Data are expressed as the AQP7/GAPDH ratio. *B*) Flow cytometric analysis of AQP7 expression in LC (CD11c $^+$ MHC class II $^+$ EpCAM $^+$) populations from the skin of WT (+/+, red) and AQP7 $^{-/-}$ mice (-/-, blue). *C*) Immunofluorescent staining of AQP7 (green) in freshly isolated LCs from WT and AQP7 $^{-/-}$ mice. Nuclei stained with DAPI (blue). Scale bar = 10 μ m. *D*) Number and size of CD11c $^+$ MHC class II $^+$ cells in the epidermal or dermal cell suspensions (means \pm SE, $n=4$).