

〔原著〕 松本歯学 36 : 115~119, 2010

key words : アクアポリン — 免疫組織化学染色 — 唾液腺導管嚢胞

## 導管嚢胞を伴った耳下腺組織における アクアポリンの局在

李 憲起<sup>1</sup>, 王 金濤<sup>2</sup>, 趙 二軍<sup>3</sup>, 楊 静<sup>4</sup>,  
上松 隆司<sup>1</sup>, 古澤 清文<sup>5</sup>

<sup>1</sup>松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

<sup>2</sup>中国河北大学附属病院口腔科

<sup>3</sup>中国河北省保定市第二病院口腔科

<sup>4</sup>松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

<sup>5</sup>松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Localization of water channel aquaporins in human parotid duct cyst

XIANQI LI<sup>1</sup>, JINTAO WANG<sup>2</sup>, ERJUN ZHAO<sup>3</sup>, JING YANG<sup>4</sup>,  
TAKASHI UEMATSU<sup>1</sup> and KIYOFUMI FURUSAWA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, Shiojiri, Japan*

<sup>2</sup>*Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, China*

<sup>3</sup>*Department of Stomatology, the Second Hospital of Baoding City, Baoding, China*

<sup>4</sup>*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, Shiojiri, Japan*

<sup>5</sup>*Department of Oral & Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, Shiojiri, Japan*

### Summary

The expression and localization of water channels, aquaporin (AQP)3 and AQP5, in human parotid duct cyst were examined by immunohistochemistry. In acinar cells surrounding striated ducts, AQP3 is very abundant at the basal and lateral surfaces, while AQP5 is strongly labeled in the apical membrane and in the intercellular canaliculi. However, weak labeling and no labeling of AQP3 and AQP5 were observed in some acinar cells at the secretory end pieces. These findings suggest that potential disorder of acinar cell occurs in salivary duct cyst, and may be responsible for the pathogenic mechanisms of salivary duct cyst.

## 緒 言

アクアポリン (aquaporin: AQP) は, 様々な細胞の細胞膜に存在し, 水輸送に重要な役割を果たす水チャネル膜蛋白質として知られている<sup>1)</sup>. AQPは現在までにAQP0~AQP12まで13種類のサブタイプが同定されており, このうち唾液腺にはAQP1, 3, 5, 8の存在が明らかにされている<sup>2)</sup>. なかでもAQP3とAQP5は唾液分泌に関与していることが報告されている<sup>3-5)</sup>. しかし, AQPが発現する生理的役割や病変に発現するAQPの病態生理についてはまだ不明な点が多いである<sup>1)</sup>.

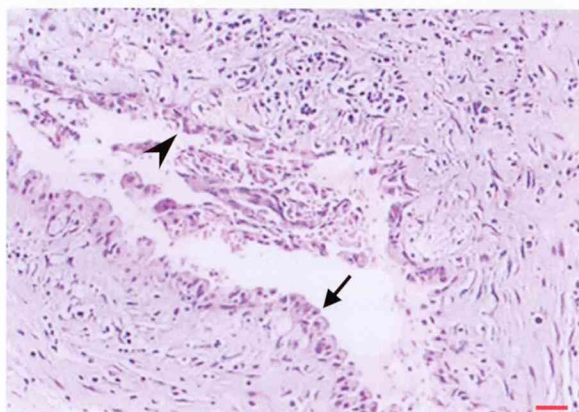
ヒト唾液腺導管嚢胞 (salivary duct cyst) は, 唾液腺の導管に局在する非新生物である. 発生部位は85%が耳下腺に, 10%が顎下腺に発生するといわれている<sup>6)</sup>. 唾液腺導管嚢胞は主に導管の閉塞を引き起こす感染や腫瘍, 外傷などの後天的要因で発生すると考えられているが, 導管嚢胞組織における水チャネル発現については不明である.

今回, ヒト耳下腺導管嚢胞の1例を経験したので, 本症例の耳下腺組織の水チャネルの変化に着目し, AQP3およびAQP5に対する免疫組織化学染色を行い, 若干の興味ある知見が得られたので報告する.

## 材料および方法

### 1. 材料

中国河北大学医学部附属病院口腔科にて, 耳下腺導管嚢胞 (1例) の臨床診断 (Fig. 1) で摘出



**Fig. 1** : Histopathological observation : Epithelial lining composed of cubical or cylindrical epithelial cells (arrow) was found in cystic wall. The part of epithelial lining showed as polyptychial (arrowhead). Bars : 50 $\mu$ m

された耳下腺組織を研究に供した. 本研究を遂行するにあたり, 中国河北大学医学部倫理委員会の承認の下, 主治医による検体提供者への十分な説明と同意を得て実施した.

### 2. 組織標本の作製

手術切除した耳下腺組織は, 直ちに10%中性緩衝ホルマリン水溶液に固定し, 通法に従いパラフィン包埋後, 4 $\mu$ mの薄切標本を作製し, 一般染色として通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E染色) を行った. また, 嚢胞を含有していない嚢胞病巣から離れた耳下腺組織を免疫組織化学染色の材料とした.

### 3. 免疫組織学的染色

免疫組織化学染色には streptavidin-biotin-complex 法を用い, 室温下で行った. 標本を脱パラフィン後に親水化し, 0.3%過酸化水素水加メタノール液を用いて30分間内因性ペルオキシダーゼを阻害した. 1.0mM EDTA 緩衝液 (pH8.0) 中に標本を浸漬して20分間マイクロウェーブ処理して, 自然冷却後0.1Mリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄した. 3%牛血清アルブミン (BSA; Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, USA) 加PBS中で30分間インキュベーションして, 非特異蛋白のブロッキングを行った. 一次抗体には抗ヒトAQP3ヤギポリクローナル抗体 (sc-9885, 1:200) と抗ヒトAQP5ヤギポリクローナル抗体 (sc-9890, 1:200) (以上 Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) を用い, 4 $^{\circ}$ Cで12時間反応させた. 二次抗体にはビオチン化抗ヤギロバポリクローナル抗体 (1:400, Beckman Coulter, Inc. USA) を用い室温で1時間反応させた. いずれの抗体も抗体希釈液として1%BSAと0.01%Triton X-100含有0.1M PBSを用いた. その後, ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories, Inc. USA) をPBSにて300倍に希釈し, 30分間反応させた. 各抗体処理とHRP標識処理の間では, 0.01% Triton X-100含有0.1M PBSで5分間, 3回の洗浄を行った. 発色には3', 3-diaminobenzidine tetrahydro-chloride (DAB; Vector Laboratories, Inc. USA) を用い, ヘマトキシリン溶液で対比染色を行った. なお, 陰性コントロールは一次抗体の代わりに1%BSA含有0.1M PBSを用いて染色を行ったものとした.

## 結 果

## 1. 摘出物の病理組織学的所見

嚢胞には立方ないし円柱上皮に被われ、一部で多層化した嚢胞壁の lining が認められ、間質にはリンパ球の浸潤がみられた (Fig.1).

## 2. AQP3 発現の検討

AQP3 は線条部導管 (SD) 周囲腺房細胞の基底面と側面細胞膜に強く発現し、一部の細胞では細胞膜全周と細胞質にも観察された (Fig.2の矢印). また、分泌終末部の腺房細胞および介在部導管細胞では (Fig.2の星印), AQP3 の発現は少なく、一部では観察されなかった.

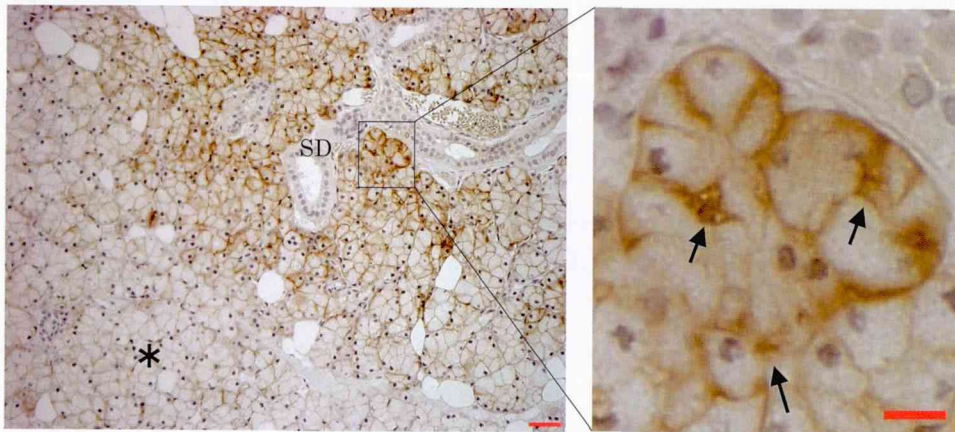
## 3. AQP5 発現の検討

線条部導管 (SD) 周囲腺房細胞の腺腔面 (頂

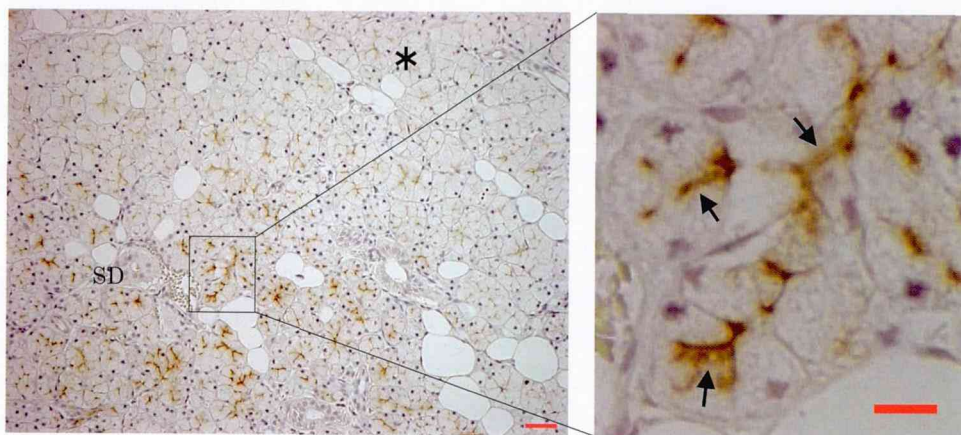
上部) 細胞膜と細胞間分泌細管 (Fig.3の矢印) に強く局在し、細胞質内にも一部観察されたが、基底面細胞膜には認められなかった. また、分泌終末部の線房細胞 (Fig.3の星印) では、AQP5 の発現は弱くなり、一部の細胞では発現がみられなかった.

## 考 察

AQP は、300前後のアミノ酸で構成され、両末端とも細胞質内に存在する6回貫通型の膜タンパク質である. ヒトにおいてはAQP0~AQP12までの13種類のサブタイプが確認されており、その構造と機能からAQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8が水の透過するchannel-like integral protein (CHIPA) と、AQP3, 7, 9, 10は水に加えて



**Fig.2:** Immunohistochemistry of AQP3 in human parotid duct cyst. AQP 3 is very abundant at the basal and lateral surfaces of the acinar cells surrounding striated ducts (SD), it is observed at a few apical surfaces too (arrow). No AQP 3 staining was observed in the some acinar cells (asterisk) at secretory end pieces. Bars : 50 $\mu$ m



**Fig.3:** Immunohistochemistry of AQP5 in human parotid duct cyst. In the acinar cells surrounding striated ducts (SD), AQP5 is strong labeling in the apical membrane and in the intercellular canaliculi (arrow). Weak labeling and no labeling of AQP 5 were observed in the some acinar cells (asterisk) at secretory end pieces. Bars : 50 $\mu$ m

Table 1: Expression and localization of AQP3 and AQP5

	Acini		Ducts
	surrounding the ducts	at secretory end pieces	
Parotid gland*	+	+	-
Parotid duct cyst	++	±	-

\*Originated from reference 3

グリセリン, 尿素などを透過させる aquaglyceroporin (GLP) の 2 グループに分類されている<sup>1,7)</sup>. また, AQP11, 12 は細胞内オルガネラに存在しており, 水を通過させないスーパーファミリーである<sup>8)</sup>.

現在では AQP1, 3, 5 はヒト唾液腺に存在することが確認され, AQP3 は腺房細胞の基底部細胞膜に存在しており, 細胞内への水分取り込みに関与している<sup>3)</sup>. また, AQP3 は細胞内浸透圧と細胞の容量を保持するために水の確保や通過性に関与することが報告されている<sup>9,10)</sup>. AQP5 の局在は腺房細胞の分泌側 (腺腔面) 細胞膜であり, その機能は腺房細胞から腺腔内に水を排出させるとされている<sup>3)</sup>. また, AQP5 ノックアウトマウスでは唾液分泌量が低下するという報告があり, 唾液腺における細胞外への水輸送の主体として AQP5 が関与していると考えられる<sup>11)</sup>.

本研究において, 線条部もしくは介在部導管周囲の腺房細胞における AQP3 の局在は, 側壁と基底部および一部の細胞では細胞膜全周と細胞質にまで認められ, AQP5 の局在も頂端部細胞膜と細胞間分泌細管および一部の細胞質にまで広がっていた一方, 分泌終末部の腺房細胞では AQP3, 5 の発現低下や消失が観察され, 正常耳下腺腺房細胞と異なる発見がみられた (Table 1). 導管囊胞という観点からみると, 水輸送を担う導管周囲の腺房細胞では, 細胞膜に存在する AQP3 および AQP5 は常に存在し, 浸透圧勾配に応じて水が通過して導管腔へ水が輸送されていると考えられる. 囊胞形成によって唾液排出障害が生じた場合, 細胞環境を保全するため AQP3 と AQP5 が細胞膜上で高密度に分布する必要があると推測される. また, 腺房細胞の水通過の増加に伴い, 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度も上昇し, この  $Ca^{2+}$  濃度の上昇がさらに AQP5 を細胞質より頂上部 (腺腔面) の細胞膜へ移動させていると考えられる<sup>12)</sup>. さらに, 導管の閉塞あるいは水の通過障害

によって導管細胞の膨化を引き起こす可能性があり, 代償性に AQP3 と AQP5 の発現が誘導された可能性も示唆される.

本研究では囊胞に連続した線条部導管周囲の腺房細胞に AQP3 と AQP5 の発現増強あるいは維持する部位もある一方, 分泌終末部の腺房細胞では AQP3, 5 の発現低下や消失がとも特徴的であり, AQP の局在の乱れが生じていると考えられる. また, 導管囊胞の形成により一部の唾液排出障害によって腺房細胞が選択的に障害され, 唾液分泌の低下という機能的な障害が部分的に引き起こされた可能性も推測される. このような腺房細胞障害の存在が腺房細胞ネットワーク<sup>3)</sup>を破壊し, 唾液分泌をさらに低下させる可能性が考えられた.

## 結 論

AQP3 と AQP5 の発現低下は耳下腺導管囊胞における腺房細胞障害を示唆しており, 耳下腺導管囊胞発症過程で AQP 発現の変動がみられる可能性があると思われた.

## 文 献

- 1) Agre P (2006) The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc* **3**: 5-13.
- 2) Delporte C and Steinfeld S (2006) Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1061-70.
- 3) Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, Varga G, Zelles T, Nielsen S, Case RM and Steward MC (2001) Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G247-54.
- 4) Li J, Lee S, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Lee JH, Chung SC, Kim JS, Lee JH and Park K (2006) Effects of pilocarpine on the secretory acinar cells in human submandibular glands. *Life Sci* **79**: 2441-7.

- 5) Motegi K, Azuma M, Tamatani T, Ashida Y and Sato M (2005) Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjögren's syndrome. *Lab Invest* **85**: 342-53.
- 6) 大塚尚志, 嶋本記里人, 西村幸司, 鈴木正道, 山崎一春, 石島 健, 菅井 有, 佐藤宏昭 (2009) 耳下腺唾液腺導管嚢胞の2例. *耳鼻臨床* **102**: 951-5.
- 7) Ishibashi K, Kuwahara M and Sasaki S (2000) Molecular biology of aquaporins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **141**: 1-32.
- 8) Ishibashi K (2009) New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12. *Handb Exp Pharmacol* **190**: 251-62.
- 9) Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S and Takata K (1999) Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J Histochem Cytochem* **47**: 1275-86.
- 10) Hara-Chikuma M and Verkman AS (2008) Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J Invest Dermatol* **128**: 2145-51.
- 11) Gresz V, Kwon TH, Gong H, Agre P, Steward MC, King LS and Nielsen S (2004) Immunolocalization of AQP-5 in rat parotid and submandibular salivary glands after stimulation or inhibition of secretion in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**: G 151-61.
- 12) Ishikawa Y, Yuan Z, Inoue N, Skowronski MT, Nakae Y, Shono M, Cho G, Yasui M, Agre P and Nielsen S (2005) Identification of AQP5 in lipid rafts and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in interlobular ducts of rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C 1303-11.