

論 文 要 旨

Thrombomodulin exerts cytoprotective effect on low-dose UVB-irradiated HaCaT cells

〔 Thrombomodulin は表皮角化 (HaCaT) 細胞における
紫外線照射 (UV-B) に対して細胞保護効果がある 〕

岩 田 政 宏

【序論および目的】

Thrombomodulin (TM) は血管内皮細胞膜上に発現し、凝固線溶系の中心的な役割を果たす分子である。近年、TM は表皮角化細胞を含む種々の細胞にも発現していることが報告され、抗炎症作用など凝固線溶系以外の機能を有する事が示唆されている。しかし、表皮角化細胞における役割は充分には解っていない。

表皮角化細胞は紫外線をはじめとする様々な外的環境ストレスに曝されており、それに対する多様な保護機能が存在する。我々は TM が抗炎症作用を有することに注目し、TM が表皮角化細胞を紫外線から保護する作用を有するか否かについて検討した。

【材料および方法】

ヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞を用い、炎症惹起作用の強い中波長紫外線 (UVB: 290 ~ 320 nm) を照射した。本研究では 302 nm の UVB を発生する線源を用いた。TM の発現量はノーザンブロッティング法、ウエスタンブロッティング法および免疫蛍光法で検討し、細胞内情報伝達を解析するため、MAP キナーゼ (MAPK: p38, JNK, ERK) のリン酸化をウエスタンブロッティング法にて解析した。転写因子である cyclic AMP response element binding protein (CREB) の活性はゲルシフト法で検討した。細胞増殖は MTT 法で解析した。MAPK の細胞増殖への関与は MAPK 選択的阻害剤を用いて薬理的に解析した。TM の細胞増殖に及ぼす影響を検討するため、siRNA で TM の発現をノックダウンした場合と、cDNA をトランスフェクトし強制発現した場合の細胞増殖活性を解析した。

【結 果】

1. TM mRNA の発現は 10 mJ/cm² UVB 照射後 1 時間で一過性に上昇した。
2. TM タンパクの発現量は 10 mJ/cm² UVB にて 2 時間後まで減少し、以後 16 時間まで時間依存性に増加した。
3. 10 mJ/cm² の UVB 照射で p38 MAPK がリン酸化された。ERK と JNK の活性化はみられなかった。
4. p38MAPK 阻害剤 SB203580 で前処置すると、10 mJ/cm² UVB 照射後の TM mRNA の発現量

は減少し、細胞増殖も抑制された。

5. 10 mJ/cm² の UVB 照射で CREB の転写活性が亢進し、これは SB203580 で抑制された。

6. UVB 照射時の細胞増殖は、TM の発現をノックダウンすると有意に抑制され、TM を強制発現させると有意に亢進した。

【結論及び考察】

上述の結果は、HaCaT 細胞に 10 mJ/cm² の UVB 照射を照射すると、p38 MAPK のリン酸化を介し CREB の転写活性が亢進し TM の発現が誘導されること、および TM が紫外線照射時の細胞増殖能に対して促進的に作用していることを示している。

ヒトの皮膚に紅斑を生じる UVB 量はおよそ数十 mJ/cm² で、今回の in vitro の実験系における 10 mJ/cm² の UVB 照射量は生活環境において皮膚障害を生じる容量にほぼ相当することから TM には表皮角化細胞を紫外線から保護する作用があると考えられる。

TM が UVB 照射から HaCaT 細胞をどのような機序で保護しているかについては今回は明らかにできなかった。紫外線による酸化は細胞障害の重要な要因であり、一方 TM のプロモーター領域 (-2157~-2148bp) には転写因子 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) の結合モチーフが存在する。Nrf2 は UVB 照射により活性化され、heme oxygenase-1 (HO-1) や NAD(P)H dehydrogenase quinone (NQO-1) など抗酸化作用のある分子の発現を誘導し細胞保護作用を示すことが明らかにされていることから、TM も抗酸化作用を介して細胞を保護している可能性が示唆される。

以上、表皮角化細胞を紫外線照射から保護するという TM の新たな生理作用を示した。

(Biochemical and Biophysical Research Communications 2008; 377(2): 642-7 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 57 号	学位申請者	岩田 政宏
審査委員	主査	米澤 傑	学位
	副査	中川 昌之	副査
	副査	古川 龍彦	副査
			岡本 実佳

**Thrombomodulin exerts cytoprotective effect on low-dose
UVB-irradiated HaCaT cells**

〔 Thrombomodulin は表皮角化 (HaCaT) 細胞における紫外線照射
(UV-B) に対して細胞保護効果がある 〕

血管内皮細胞膜上の Thrombomodulin (TM) は、凝固線溶系の中心的な役割を果たしている。最近、TM は、凝固線溶系以外に抗炎症作用などの機能を有する事が報告されている。学位申請者らは TM が抗炎症作用を有することに注目し、TM が表皮角化細胞を紫外線から保護する作用を有するか否かについて検討した。表皮角化細胞株には HaCaT 細胞を用い、TM の発現の確認には、ノーザンブロット法、ウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法を用いた。細胞内シグナル伝達に関しては、MAPKs (ERK1/2, JNK, p38MAPK) の活性化をそれぞれのリン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法で、cyclic AMP response element binding protein (CREB) の活性化をゲルシフト法で解析した。細胞の viability は、MTT 法で検討した。MAPK と TM の関連は MAPK 選択的阻害剤を用いて検討し、TM の cell viability に関わる機能は、siRNA で TM をノックダウンした細胞と、cDNA を遺伝子導入し TM を過剰発現した細胞を作製し検討した。

その結果、以下の知見が明らかにされた。

1. TM mRNA の発現は 10 mJ/cm² UVB 照射後 1 時間より上昇した。
2. TM タンパクの発現量は 10 mJ/cm² UVB にて 2 時間後まで減少し、以後 16 時間まで時間依存性に増加した。
3. 10 mJ/cm² の UVB 照射で p38MAPK のみが活性化された。
4. 10 mJ/cm² の UVB 照射で CREB の転写活性が亢進し、これは p38MAPK 阻害剤 SB203580 で抑制された。
5. p38MAPK 阻害剤 SB203580 の前処置により、10 mJ/cm² UVB 照射後の TM mRNA の発現量は減少し、cell viability も抑制された。
6. UVB 照射時の細胞増殖は、TM の発現をノックダウンすると有意に抑制され、TM を強制発現させると有意に亢進した。

ヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞を用いて、TM の新たな機能、すなわち紫外線に対する細胞保護作用を明らかにした。紫外線による細胞障害の重要な要因の一つに酸化ストレスがある。一方 TM のプロモーター領域 (-2157 ~ -2148bp) には転写因子 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) の結合モチーフが存在する。Nrf2 は、UVB 照射により活性化し、heme oxygenase-1 (HO-1) や NAD(P)H dehydrogenase quinone (NQO-1) など抗酸化作用のある分子のプロモーターに結合部位の存在が明らかにされている。したがって TM も抗酸化作用を介して細胞を保護している可能性が考えられる。

本研究は、紫外線照射における TM の細胞保護作用について検討した。その結果、TM は表皮角化細胞を紫外線から保護するという新たな機能が示された。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 57 号		学位申請者	岩田 政宏
審査委員	主査	米澤 傑	学位	博士 (医学)
	副査	中川 昌之	副査	夏越 祥次
	副査	古川 龍彦	副査	岡本 実佳

主査および副査の5名は、平成21年2月9日、学位申請者 岩田 政宏 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) HaCaT 細胞以外の表皮角化細胞では検討していないのか？

(回答) 今回は HaCaT 細胞のみで検討した。不死化している非腫瘍性表皮角化細胞株は少なく、HaCaT 細胞が最も一般的であり、学術的にも認知されている細胞である。

質問2) 生体でも実際に今回の実験のような現象が起きるのかを検討するために、皮膚のバイオプシーのサンプルや手術の正常部位を使って、Thrombomodulin (TM) の作用を見た実験があるのか？

(回答) 今回は in vivo の実験は行っていない。

質問3) TM を外用剤として使用すれば皮膚の炎症を抑制することができるのか？

(回答) マウスの耳介への TM の局所投与で紫外線による炎症を抑制したとの報告があり、外用剤での抗炎症作用も期待でき、治療を視野に入れて研究を進めている。

質問4) Fig. 1 でウエスタンブロットにて2時間後に TM の蛋白の発現量が減少するのはどのように考えるのか？

(回答) 血管内皮細胞では thrombin で刺激された場合に TM が細胞内に internalize されるという報告があるので、膜画分と細胞質画分に分けて発現を調べたが、細胞質画分から検出されなかった。また shed される可能性も考えたが、培養上清中にも検出されなかった。

質問5) Fig. 2C で p38MAPK 阻害剤により cell viability は 30 %ほど減少しているが、もっと抑制できるのではないのか？

(回答) 表皮角化細胞は紫外線に対して多様な保護機能が存在し、今回はその1つと考えられる TM を p38MAPK 阻害剤にて抑制しているが、他の保護機能が作用している可能性があり、結果に示すような cell viability となった。

質問6) 今回 MAPK の系を中心にみているが、他の系はみていないのか？

(回答) 他の系については今回は検討していない。UVB 照射時の細胞応答については、MAPK を検討した報告が多いので、私達もこの系を検討した。

質問7) Fig. 2 で 25 mJ/cm², 50 mJ/cm² UVB 照射時には、JNK のアポトーシスへの関与が示唆されたが、TM の発現に対して JNK が negative に作用した可能性はあるのか？

(回答) TM のプロモーター領域には、JNK の下流の AP-1 が結合するサイトは無く、また JNK が p38MAPK のリン酸化を抑制するという報告は無いので、JNK が negative に作用した可能性は低いと考えられる。

質問8) Fig. 2C で 10 mJ/cm² UVB 照射後の cell viability を検討しているが、UVB 照射前における cell viability は比較しているのか？

(回答) p38MAPK 阻害剤を添加した細胞と無刺激の細胞において cell viability を比較したが、有意な差は認めなかった。

質問9) Fig. 4B で UVB を照射後の強制発現させた細胞での TM の発現は検討したか？

(回答) TM を強制発現させているので、UVB の照射にかかわらず、コントロールと比較して、TM の発現は常に過剰に発現している。

質問10) Fig. 4B の実験は複数の株で検討しているのか？

(回答) 我々は3つのクローン細胞を用いて実験を行なったが、発現量に差は認めなかった。

質問11) TM は clock control gene とあるがどのような発現なのか？

(回答) 人工的な条件下において、in vitro では、TM は夜間に発現が上昇する。

最終試験の結果の要旨

質問 12) 基底層上層から有棘細胞で TM は強く発現しているが、その理由は推測されているのか？

(回答) 表皮角化細胞は基底層、有棘層、顆粒層、角層と分化していく中で、それぞれ発現する蛋白も異なっている。TM は基底層上層から有棘層で強く発現していることから、分化に伴って発現が調節されているためと考えられる。

質問 13) 皮膚において紫外線以外に TM の発現の起因となるような物の報告はあるのか？

(回答) 創傷治癒の過程において TM の発現量が上昇するという報告がある。

質問 14) 炎症で TM の発現が上昇すると考えられるが、これは温熱のような刺激でも発現が上昇するのか？

(回答) Hyperthermia によって PKA が上昇するという報告があり、cAMP → PKA → CREB 系で TM の発現が上昇する可能性が示唆される。

質問 15) TM は細胞接着に関しては Ca 濃度依存性であるが、今回の実験も Ca 濃度を変えると同じような事がおこるのか？

(回答) 表皮角化細胞の分化も Ca 濃度依存性であるので、ご指摘の可能性は考えられる。

質問 16) p38MAPK は多機能であるが、今回の実験では p38MAPK がどの経路で関与していると考えているか？

(回答) p38MAPK には α 、 β のアイソフォームが存在し、 β -p38MAPK が細胞生存に関与しているという報告があり、今回の実験には β -p38MAPK が関与していると推測している。

質問 17) 10 mJ/cm² UVB が今回の実験で適切であるという理由は？

(回答) ヒトの皮膚に紅斑を生じる UVB 量はおよそ数十 mJ/cm² で、今回の invitro の実験系における 10 mJ/cm² の UVB 照射量は生活環境において皮膚障害を生じる線量にほぼ相当することから、我々の条件は適切であると考えられる。

質問 18) 5 mJ/cm² UVB ではどのような結果になると考えられるか？

(回答) Supplement Fig 1 で 5 mJ/cm² UVB では TM の mRNA の発現は上昇を認めていないので、今回示したような作用は働かないと考える。また 5 mJ/cm² UVB のような小線量では細胞を障害しないとの報告がある。

質問 19) HaCaT 細胞は継代後何日目とか決めて使っているのか？

(回答) 初代培養細胞ではないので決めていない。HaCaT 細胞は非腫瘍性、不死化細胞株であるので継代数を統一して使用した。

質問 20) コンフルエントの状態を実験する、あるいはコンフルエントになる前の状態で実験を始めるなど条件を決めているのか？

(回答) HaCaT 細胞はコンフルエントになると接触阻害が起きるため、UVB 照射時に 80% コンフルエントになるようにして実験を行なった。

質問 21) この実験は分化型、未分化型どちらの表皮角化細胞を用いた実験なのか？

(回答) 通常の Ca 濃度で培養しており、分化していると考えている。

質問 22) Fig 1A では UVB 照射前では、TM の mRNA は発現していないのか？

(回答) TM の半減期は実験的には 96 時間と非常に長く、mRNA の発現は非常に低く抑えられていると考えている。

質問 23) 創傷治癒の過程において、一度 TM の発現が減少し、修復の過程で脱分化のような形になって、また発現してくるといふ論文があるが、今回の実験では UVB によって細胞が障害され、脱分化し、それに反動的にして TM の発現が上昇したという可能性はあるのか？

(回答) HaCaT 細胞において、UVB 照射によって脱分化が起こるといふ報告は無く可能性は低い。

質問 24) UVB の照射によって ERK のリン酸化はみられていないが、この事についてどのように考えているか？

(回答) 他の報告では UVB 照射にて ERK がリン酸化される報告はある。しかし、今回の条件ではリン酸化は認めなかった。

質問 25) siRNA の導入で cell viability など細胞に変化は起きなかったか？

(回答) siRNA を導入した細胞と対照の細胞の viability を MTT 法で比較し、差が無いことを確認の上、実験を行った。

質問 26) siRNA を導入した細胞の分化について、分化マーカーを用いて、siRNA を導入していない細胞と差が無いことは確認したのか？

(回答) 分化マーカーによる確認は行っていないが、顕微鏡下では形態学的な差は認めなかった。

質問 27) 皮膚と同じ扁平上皮である食道などでも今回の実験と同じような事が起こると考えられるのか？

(回答) 今回は皮膚の細胞で実験をおこなったので刺激として紫外線を用い、考察にある Nrf2 の経路に行くことが考えられた。食道においてはアルコールや酸化の刺激でも同様なことが起こると考えられる。

質問 28) 紅斑が出来ないくらいの線量とはどのくらいか？

(回答) 人間の最小紅斑量は数十 mJ/cm² である。紅斑を生じない線量はさらに少ない線量である。

質問 29) 日光角化症のような慢性的な紫外線刺激に対する疾患で、皮膚の免疫染色などは行っていないか？

(回答) 行っていない。急性期の紫外線障害時に見られるような変化が、慢性障害時でも起こる事は知られている。例えば、膠原病の皮膚において ER stress に対する変化がみられる。よって慢性的な紫外線障害を受けた場合に、皮膚での TM の発現が変化している可能性はある。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。