



Low-Dose Ultraviolet B Radiation Synergizes with TNF- α to Induce Apoptosis of Keratinocytes

鶴, 顕太

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2331

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002331>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【107】

氏 名・(本 籍) 鶴 顕太 (佐賀県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博い第1345号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成13年3月31日

【学位論文題目】

**Low-Dose Ultraviolet B Radiation Synergizes withTNF- α
to induce Apoptosis of Keratinocytes**

低量紫外線BはTNF- α と相乗的にはたらき
ケラチノサイトのアポトーシスを誘導する

審 査 委 員

主査 教授 市橋 正光

教授 堀田 博 教授 熊谷 俊一

緒 言

近年、オゾン層の破壊により地上に降りそそぐ紫外線量の増加が問題となっている。このため紫外線が人体に与える影響についての知見を得ることはますます重要となってきた。皮膚は人体の臓器の中でも直接紫外線の影響を受けるという点では最も重要な標的臓器である。皮膚が大量の紫外線 B に暴露されると表皮ケラチノサイトが apoptosis に陥り、sunburn cell と呼ばれる独特の形態の変化を起こす。一方、低量の紫外線 B (ultraviolet B, UVB) 照射ではケラチノサイトの apoptosis はおこらない。UVB によるケラチノサイトの apoptosis の誘導の機序には Fas, TNF- α , p53 などが関与しているとの報告がなされてきたが、なお不明な点も多い。とくに TNF- α は UVB 照射によりケラチノサイトからの産生が誘導されることが報告されており、UVB による apoptosis との関連が示唆されるサイトカインである。UVB のケラチノサイトの apoptosis 誘導における TNF- α の役割を検討するため、低量 UVB 照射とともに TNF- α をケラチノサイトに加える系で解析した。

方法、結果と考察

まず in vitro の apoptosis の検出のためのアッセイ系を確立した。UVB 0-50mJ/cm² を培養ヒトケラチノサイトに照射し、24 時間後に cell death detection ELISA kit を用い apoptosis 細胞を定量した (Fig1)。ヒトケラチノサイトが UVB 単独で apoptosis を起こさない量は 5mJ/cm² であり、UVB 20mJ/cm² 以上では apoptosis が誘導されることがわかった。次に apoptosis を起こさない用量である UVB 5mJ/cm² の照射直後に TNF- α を添加し、apoptosis が誘導されるか否かを検討した。TNF- α 15ng/ml で著しい apoptosis が起きることが明らかになった (Fig2A)。しかし TNF- α 15ng/ml 単独では apoptosis は起きなかった。TNF α の受容体には TNF receptor 1 (TNFR1) と TNF receptor 2 (TNFR2) の 2 種類が存在するが、ケラチノサイトでは TNF- α は主に細胞膜上に存在する TNFR1 と結合することが知られている。TNFR1 の細胞膜上での凝集が起これば細胞内にシグナル

が伝達され、apoptosis を起こすことが他の細胞ではよく知られている。低量 UVB と TNF- α の組み合わせによる刺激によりヒトケラチノサイトに apoptosis を起こさせる条件下で TNFR1 の中和抗体を添加したところ、有意に apoptosis が抑制された (Fig2B)。次に低量 UVB 照射後の様々な時間に TNF- α を添加したところ、照射後 30 分以内では著明な apoptosis を誘導しえたが、60 分以後では apoptosis が観察されなかった (Fig 3)。この結果より低量 UVB と TNF- α で起こる apoptosis は低量 UVB 照射後のごく短時間だけこの組み合わせによる刺激が細胞内に apoptosis のシグナルを伝達をする状況が作られる可能性を示した。

Rosette と Karin は大量の UVB 照射によりサイトカイン受容体や (ケラチノサイトにおける TNFR1 を含む) 成長因子受容体の凝集を起こし、これらのレセプターからシグナル伝達を引き起こされることを示した。Aragane らは HaCaT 細胞において、大量の UVB 照射は異なった apoptosis 伝達シグナル系を介する細胞表面レセプター分子である Fas の三量体形成を誘導し、細胞死のシグナル伝達が活性化して apoptosis を引き起こすことを報告している。また UVB が線維芽細胞の細胞膜上の EGF receptor の可動性をあげることも報告されている。以上の点から低量 UVB と TNF- α の組み合わせによる刺激では TNFR1 の凝集が細胞膜上で起こることで apoptosis が引き起こされる可能性を考えた。

TNFR1 の凝集が亢進していることを検討するために、培養ヒトケラチノサイトに無処理、低量 UVB 単独、TNF- α 単独、低量 UVB と TNF- α の両者の各処理を行い TNFR1 の抗体を用いて免疫染色を施行し confocal microscopy で観察した。低量 UVB と TNF- α の組み合わせによる刺激の処理を行った細胞では TNFR1 が細胞膜上で凝集を起こしていることを示す所見を得た (Fig 4)。この TNFR1 の凝集の亢進が低量 UVB 照射による TNFR1 の細胞膜上での発現増加のためか否かを培養ヒトケラチノサイトで TNFR1 の抗体を用いて FACS で解析した。低量 UVB 照射直後、1 時間後、および 2 時間後のいずれも TNFR1 の細胞膜上での発現量は無照射群と差はなかった。TNF- α 自身が TNFR1 の凝集をおこすことから低量 UVB は TNF- α が TNFR1 結合によってひきおこされる凝集を

より強くすると考えられる。

低量 UVB と TNF- α の組み合わせによりケラチノサイトの apoptosis が誘導されることを確認するために、ヒト正常皮膚を器官培養してこれらの処理を行った。培養した皮膚組織片をパラフィン包埋した後に hematoxylin-eosin 染色により sunburn cell が誘導されるかどうかについて検討した。また TUNEL 法により DNA 断片端を染色することでケラチノサイトの apoptosis が誘導されるかどうかについて検討した。低量 UVB または TNF- α 単独ではほとんど sunburn cell または apoptosis は認められなかったが、低量 UVB を照射した後 TNF- α を添加すると表皮基底層にケラチノサイトの apoptosis が数多くみられた。

結 語

以上我々は、低量 UVB 照射と TNF- α の組み合わせ刺激で *in vitro* および *in vivo* においてケラチノサイトに apoptosis を誘導することを明らかにした。さらにこの組み合わせ刺激による apoptosis の誘導において UVB は、細胞膜に影響を与え TNF- α の結合による TNFR1 の細胞膜上での凝集を促進させることを示唆する結果を得た。ただし TNF- α のシグナル伝達機構には apoptosis を抑制するものもあり、この組み合わせによる apoptosis の誘導機構の正確なメカニズムについては今後のさらなる検討が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1350号	氏名	鶴 顕 太
論文題目	Low-Dose Ultraviolet B Radiation Synergizes with TNF-α to Induce Apoptosis of Keratinocytes 低量紫外線BはTNF-αと相乗的に働きケラチノサイトのアポトーシスを誘導する		
審査委員	主 査 市 橋 正 光 副 査 熊 谷 俊 一 副 査 堀 田 博		
審査終了日	平成 13 年 2 月 27日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

近年、オゾン層の破壊により地上に降りそそぐ紫外線量の増加が問題となっており、人体に与える影響についての知見を得ることはますます重要となってきた。皮膚が大量の紫外線B (ultraviolet B,UVB) に暴露されると表皮ケラチノサイトがアポトーシスに陥り、サンバーンセルと呼ばれる独特の形態の変化を起こす。一方、低線量のUVB照射ではケラチノサイトのアポトーシスはおこらない。UVBによるケラチノサイトのアポトーシスの誘導にはFas, TNF- α , p53などが関与しているとの報告がなされてきたが、なお不明な点も多い。とくにTNF- α はUVB照射によりケラチノサイトからの産生が誘導されることが報告されており、UVBによるアポトーシスとの関連が示唆されるサイトカインである。UVBのケラチノサイトのアポトーシス誘導におけるTNF- α の役割を検討するため、低線量UVB照射とともにTNF- α をケラチノサイトに加える系で解析した。

まずin vitroのアポトーシスの検出のためのアッセイ系を確立した。UVB 0-50mJ/cm²を培養ヒトケラチノサイト (以下KC)に照射し、24時間後に細胞死ELISA kitを用いアポトーシス細胞を定量した (Fig1)。角化細胞はUVB単独20mJ/cm²以上でアポトーシスが誘導されることがわかった。次にアポトーシスを起こさない用量であるUVB 5mJ/cm²の照射直後にTNF- α を添加し、アポトーシスが誘導されるか否かを検討したところ、TNF- α 15ng/mlで著しいアポトーシスが起きた (Fig2A)。TNF- α 15ng/ml単独ではアポトーシスは起きなかった。ケラチノサイトではTNF- α は主に細胞膜上に存在するTNF receptor 1(TNFR1)と結合する。TNFR1の細胞膜上での凝集が起これば細胞内にシグナルが伝達され、アポトーシスを起こすことが他の細胞ではよく知られている。低線量UVBとTNF- α の組み合わせによる刺激によりKCにアポトーシスを起こさせる条件下でTNFR1の中和抗体を添加したところ、有意にアポトーシスが抑制された (Fig2B)。次に低線量UVB照射後間隔をあけてTNF- α を添加したところ、照射後30分以内でしかアポトーシスは誘導しえなかった (Fig3)。この結果より低線量UVB照射後のごく短時間だけUVBとTNF- α の組み合わせによる刺激が細胞内にアポトーシスのシグナルを伝達をする状況が作られ

ると考えられた。

Rosetteらは大量のUVB照射によりサイトカイン受容体や成長因子受容体の凝集を起こし、これらの受容体からシグナル伝達が引き起こされることを示した。AraganeらはHaCaT細胞において、大量のUVB照射は異なったアポトーシス伝達シグナル系を介する細胞表層レセプター分子であるFasの三量体形成を誘導し、細胞死のシグナル伝達が活性化してアポトーシスを引き起こすことを報告した。またUVBが線維芽細胞の細胞膜上のEGF receptorの可動性をあげることも報告されている。以上の点から低線量UVBとTNF- α の組み合わせによる刺激ではTNFR1の凝集が細胞膜上で起こることでアポトーシスが引き起こされる可能性を考え以下の実験をおこなった。

培養KCに無処理、低線量UVBとTNF- α の併用あるいは単独の各処理を行いTNFR1の抗体を用いて免疫染色を施行したところ、低線量UVBとTNF- α の組み合わせによる刺激の処理を行った細胞ではTNFR1が細胞膜上で凝集を起こしていることを示す所見を得た (Fig 4)。TNF- α 自身がTNFR1の凝集をおこすことから低線量UVBはTNF- α がTNFR1結合によってひきおこされる凝集をより強くすると考えられた。

次に、低線量UVBとTNF- α の組み合わせによりin vivoでケラチノサイトのアポトーシスが誘導されることを確認するために、ヒト正常皮膚を器官培養してこれらの処理を行った。培養した皮膚組織片をHE染色とTUNEL染色をすることでケラチノサイトのアポトーシスが誘導されるかどうかについて検討した。低線量UVBまたはTNF- α 単独ではほとんどアポトーシスは認められなかったが、低線量UVBを照射した後TNF- α を添加すると表皮基底層にケラチノサイトのアポトーシスが数多くみられた。

低線量UVB照射とTNF- α の組み合わせ刺激でin vitroおよびin vivoにおいてケラチノサイトにアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらにこの組み合わせ刺激によるアポトーシスの誘導においてUVBは、TNF- α の結合によるTNFR1の細胞膜上での凝集を促進させることを示唆する結果を得た。

本研究は表皮角化細胞の紫外線誘発アポトーシスについて、サイトカインTNF- α の役割を明らかにし、さらにアポトーシス誘導の機序として従来ほとんど明らかにされていなかった低線量UVBの作用について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。