



# Inflammatory Cytokine TNF- $\alpha$ enhances NGF Production in Human Keratinocytes, HaCaT Cells.

高岡, 幸二

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-12-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3082

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003082>

※ 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。



氏 名 高岡 幸二  
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)  
学 位 記 番 号 博ろ第 3082 号  
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当  
学位授与の日付 平成 21 年 12 月 8 日

【 学位論文題目 】

Inflammatory Cytokine TNF- $\alpha$  enhances NGF Production in Human Keratinocytes, HaCaT Cells.(炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  はヒト角化細胞である HaCaT 細胞において NGF の生成を促進する。)

審 査 委 員

主 査 教 授 錦織 千佳子  
教 授 苅田 典生  
教 授 中村 俊一

## 学位論文の内容要旨

### Inflammatory Cytokine TNF- $\alpha$ enhances NGF Production in Human Keratinocytes, HaCaT Cells.

炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ はヒト角化細胞である HaCaT 細胞  
において NGF の生成を促進する。

(指導教員：神戸大学大学院医学系研究科生理学・細胞生物学神経情報伝達学専攻 齋藤尚  
亮教授)

高岡 幸二

## I 緒言

アトピー性皮膚炎と乾癬は最も代表的な炎症性の皮膚疾患である。アトピー性皮膚炎や乾癬などの皮膚疾患の炎症部位ではマクロファージのような炎症性細胞の浸潤がみられる。またこれらの疾患では、神経線維が表皮まで異常に伸長しており、患部における過敏性の原因となっている。これらの疾患における患部の表皮内では神経成長因子 (NGF) 含量の増加が報告されている。NGF は神経系をはじめ多くの組織において分泌されるが、皮膚のケラチノサイトにおいても分泌されることが知られている。この表皮内で増加した NGF が神経線維の異常な伸長の原因であると考えられ、そのことが皮膚の過敏性の発症の一因であるのかもしれない。これらの炎症性皮膚疾患における過敏性の増加は、患部の治療効率を低下させるだけでなく、患者の QOL を低下させる。したがって、NGF の産生量をコントロールすることは、これらの皮膚疾患において重要な命題となっている。しかしながら、炎症性皮膚における NGF 生成の増加機構は未だ不明である。我々は、表皮に浸潤した炎症性細胞が炎症性サイトカインなどのシグナルを分泌することでケラチノサイトにおける NGF の産生を増加させているとの仮説を立て、ヒトケラチノサイトである HaCaT 細胞を用いて、炎症性サイトカインの NGF 産生に及ぼす影響を調べた。その結果、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$  がケラチノサイトにおける NGF 生成を促進することを明らかにした。またそのシグナル伝達経路についても明らかにした。

## II 材料と方法

### 細胞

不死化したヒトケラチノサイトのセルラインである HaCaT 細胞を、6 穴プレートを用いて、10%FBS を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養した。

### NGF 測定

HaCaT 細胞を 48 時間培養し、サブコンフルエントな細胞に TNF- $\alpha$  を処理して 24 時間培養し、培地中に分泌された NGF を NGF Emax イムノアッセイシステム (プロメガ) を用いて測定した。

### ウェスタンブロッティング

細胞を 10cm シャーレで 48 時間培養し、サブコンフルエントな細胞に TNF- $\alpha$  を処理して 24 時間培養し、細胞を回収してタンパク質を抽出し、SDS-PAGE を行った。さらにニトロセルロース膜へ電気的に転写させ、抗-ERK 抗体および抗リン酸化 ERK 抗体を一次抗体として用い、次いでペルオキシダーゼ結合抗体を用いて化学発光法で検出した。

### 定量的 RT-PCR

HaCaT 細胞から、市販試薬 (TRIzol Reagent ; インビトロジェン) を用いて総 RNA を抽出した。総 RNA から cDNA を調製し、ABI Prism 7000 (アプライドバイオシステムズ) を用いてリアルタイム PCR を行い、NGF の mRNA を定量した。プライマーとしては、以下の配列を用いた。

NGF : 5'-primer 5'-TCA TCA TCC CAT CCC ATC TT-3'

3'-primer 5'-CTT GAC AAA GGT GTG AGT CG-3'  
β-actin : 5'-primer 5'-TCT TCC AGC CTT CCT TCC TG-3'  
3'-primer 5'-CAA TGC CAG GGT ACA TGG TG-3'.

### III 結果および考察

炎症性サイトカインである TNF-α はケラチノサイトにおける NGF の産生を促進し、コントロールに比べると 10 ng/ml の TNF-α は NGF の産生を 3.3 倍増加させた。一方、インターフェロン (IFN) -γ およびインターロイキン (IL) -6 は NGF の産生を促進せず、むしろ IFN-γ は阻害的に働いた。NGF 産生の促進には培地中の血清が必要であり、TNF-α 未処理におけるケラチノサイトの NGF 産生量は、血清非存在下で 0.46±0.31 pg/ml であったのに対し、血清存在下では 2.78±0.33 pg/ml であった。また、TNF-α による NGF 産生の増加は Raf-1 キナーゼ阻害剤 (GW5074) やマイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (MEK) の阻害剤 (PD98059) によって阻害されたのに対し p38 MAP キナーゼの阻害剤 (SB203580) や Jun-N 末端キナーゼの阻害剤 (SP600125) によっては阻害されなかった。実際 MEK によって活性化される細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) のリン酸化が TNF-α 処理によって促進され、そのリン酸化の時期は血清のみの刺激に比べて 30 分早くなることが明らかになった。また、NGF の mRNA の発現は同様に、TNF-α 処理によって促進され、その発現時間は血清のみに比べて 6 時間早くなった。TNF-α による NGF 産生の促進はシクロヘキシミド処理によって阻害されたので、NGF 産生はタンパク質合成を伴っており、合成された NGF は速やかに細胞外に分泌されることも明らかになった。これらのことは、TNF-α による NGF 産生の促進は、Raf-1/ MEK/ ERK の経路を経て NGF の合成および分泌が加速かつ増強されるためであることを示していた。

一方、NGF の産生には血清が必要であったが、血清を熱処理すると、56°C で 30 分処理した場合には NGF の産生が約 34% 低下した。また 80°C で 10 分処理することによって NGF の産生は完全に消失した。このことから、血清中の因子はタンパク質であることが予測された。そこで血清中の因子を探索した結果、少なくとも表皮細胞成長因子 (EGF) がその因子のひとつであることが明らかになった。EGF による NGF 産生の促進は、MEK の阻害剤 (PD98059)、Raf-1 キナーゼ阻害剤 (GW5074) および EGF レセプター阻害剤 (AG1478) によって阻害された。しかしながら、EGF は血清による NGF 産生の促進を完全に代替することはできなかったため、補体などの他の因子の存在も示唆された。

以上のことから、ケラチノサイトは定常的に少量の NGF を分泌しており、細胞の増殖や維持に必要であると考えられるが、炎症性細胞からのサイトカインの刺激によって、ケラチノサイトから分泌される NGF 量は増加し、そのため表皮内への異常な神経線維の伸長が起こるものと推測された。したがって、アトピー性皮膚炎や乾癬などの炎症性皮膚疾患における皮膚の過敏性の発症を抑えるためには、NGF を直接標的とするよりも、TNF-α のような NGF 産生を増加させるサイトカインの働きを抑えることが、新しいアプローチとして有効

であることが示唆された。実際に、乾癬の治療には TNF-α 阻害薬が用いられ、成果をあげているが、これらの炎症性皮膚疾患における過敏性の改善、予防、治療等にはまだ使用されていない。今後の検討が期待される。

### IV 結語

我々は、ヒトケラチノサイトにおいて、炎症性サイトカインである TNF-α が NGF 産生を促進することを発見した。さらに、TNF-α は Raf-1/ MEK/ ERK の経路を通じて NGF の産生を促進することを明らかにした。これらの結果は、炎症性の皮膚疾患において、炎症および炎症性細胞の表皮内への浸潤が TNF-α のような炎症性サイトカインを介して NGF 産生の増加を引き起こし、表皮内への異常な神経の伸長およびその結果生じる皮膚の過敏性の原因となっていることを示していた。したがって、これらの皮膚疾患において、NGF の産生や神経の異常な伸長を抑えるための治療に TNF-α およびその受容体が新しい標的として有効であることを示している。

| 論文審査の結果の要旨                       |   |    |       |
|----------------------------------|---|----|-------|
| 受付番号                             | 乙 第2064号  | 氏名 | 高岡 幸二 |
| 論文題目<br>Title of<br>Dissertation | Inflammatory Cytokine TNF-alpha enhances NGF Production in Human Keratinocytes, HaCaT Cells.<br>炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ はヒト角化細胞である HaCaT 細胞において NGF の生成を促進する。 |    |       |
| 審査委員<br>Examiner                 | 主 査 錦織 千佳子<br>Chief Examiner<br>副 査 花田 典生<br>Vice-examiner<br>副 査 中村 俊一<br>Vice-examiner  |    |       |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

アトピー性皮膚炎や乾癬などの皮膚疾患の炎症部位ではマクロファージのような炎症性細胞の浸潤がみられる。また、神経線維が表皮まで異常に伸長しており、患部における過敏性の一因となっている。これらの疾患における患部の表皮内では神経成長因子 (NGF) 含量の増加が報告されており、神経線維の異常な伸長の原因であると考えられる。これらの皮膚における過敏性の増加は、患部の治療効率を低下させ、患者の QOL をも低下させる。したがって、NGF の産生量をコントロールすることは、これらの皮膚疾患において重要な命題となっている。しかしながら、炎症性皮膚における NGF 生成の増加機構は未だ不明である。申請者たちは、表皮に浸潤した炎症性細胞が炎症性サイトカインなどのシグナルを分泌することでケラチノサイトにおける NGF の産生を増加させているとの仮説を立て、ヒトケラチノサイトである HaCaT 細胞を用いて、炎症性サイトカインの NGF 産生に及ぼす影響を調べた。

その結果、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  はケラチノサイトにおける NGF の産生を促進することが明らかになった。一方、インターフェロン (IFN) - $\gamma$  およびインターロイキン (IL) -6 は NGF の産生を促進しなかった。また、TNF- $\alpha$  による NGF 産生の増加は Raf-1 キナーゼ阻害剤 (GW5074) や MEK の阻害剤 (PD98059) によって阻害されたのに対し p38 MAP キナーゼの阻害剤 (SB203580) や JNK の阻害剤 (SP600125) によっては阻害されなかった。また、NGF の mRNA の発現は、TNF- $\alpha$  処理によって促進され、その発現時間は血清のみに比べて早くなった。TNF- $\alpha$  による NGF 産生の促進は NGF タンパク質の合成を伴っており、合成された NGF は速やかに細胞外に分泌された。これらのことは、TNF- $\alpha$  による NGF 産生の促進は、Raf-1/ MEK/ ERK の経路を経て NGF の合成および分泌が加速かつ増強されるためであることを示していた。

一方、NGF の産生には血清が必要であったが、血清中の因子を探索した結果、少なくとも EGF がその因子のひとつであることが明らかになった。EGF による NGF 産生の促進は、MEK の阻害剤 (PD98059)、Raf-1 キナーゼ阻害剤 (GW5074) および EGF レセプター阻害剤 (AG1478) によって阻害されることを示した。

以上のことから、ケラチノサイトは定常的に少量の NGF を分泌しており、細胞の増殖や維持に必要であると考えられるが、炎症性細胞からのサイトカインの刺激によって、ケラチノサイトから分泌される NGF 量は増加し、そのため表皮内への異常な神経線維の伸長が起こるものと推測された。したがって、炎症性皮膚疾患における皮膚の過敏性の発症を抑えるためには、TNF- $\alpha$  のような NGF 産生を増加させるサイトカインの働きを抑えることが、新しいアプローチとして有効であることが示唆された。

本研究は NGF の表皮角化細胞からの分泌を促進する因子の 1 つとして TNF- $\alpha$  に着目し、そのシグナル伝達経路の一部を明らかにしたものであり、従来ほとんど行われなかったサイトカインと神経線維の伸長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。