

人皮膚細胞 HaCaT の特性について

Characterization of human keratinocyte (HaCaT)

仁科 淳良・倉兼 静江

Atsuyoshi Nishina and Shizue Kurakane

1. はじめに

近年、フロンガスの増加により、オゾンが減少するとともに地上に到達する紫外線量(UV)が増えている。オゾンホールは、南極や北極上空の成層圏のオゾン層における春期のオゾンの濃度の減少を指す。特徴として、①南極上空に顕著にあらわれる ②春から初夏にかけてあらわれる ③年々規模が拡大することがあげられる。オゾンは大気中では微量な存在に過ぎないが、太陽から放射される紫外線の大部分を吸収し、地上にほとんど紫外線を到達させない役割を担っている。オゾンが減少すると対流圏に紫外線が到達し、成層圏で起きていたオゾン生成の光化学反応が対流圏で生じようになるが、対流圏でのオゾンは存在期間が短いため、地表へはより多くの紫外線が到達することになる。

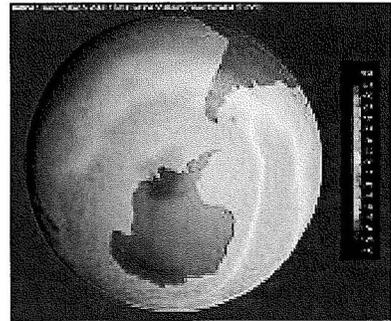


図1 南極上空のオゾンホール

紫外線はUVA・UVB・UVCの3種類に分けられる。



図2 波長とその名称

UVCは大気を殆ど通過しないので、人体に影響を与えるのはUVAとUVBの2種類である。UVAは、真皮にまで達し、たんぱく質を変性させ、シワの原因にもなり、皮膚の加齢を加速させる。UVAによる日焼けは紅斑(赤み)を起こさず、後になって日焼けを起こす。UVBを多く浴びると皮膚がんを引き起こす。UVBにより、遺伝子DNAが傷つくが、約2日で修復される。その過程で遺伝子の突然変異が起こる場合があり、皮膚がんの大きな原因になる。紫外線の10%の増大は、男性に対しては19%、女性に対しては16%の皮膚がんの増加になる。すなわち、紫外線量の増加は皮膚ガンと相関があり、地上に到達する紫外線対策のために、安全性の高い、できれば天然の皮膚保護作用を有する素材が求められている。

紫外線と皮膚がんとの関連に関しては、多くの報告がある。Stockらは、高速道路作業員の皮膚がんに関して[1]、MedhaugらはノルウエーのUV照射量と皮膚がんの関係[2]、Mubrukらは、UV照射量とDNA傷害の関係[3]について報告している。

これまで、HaCaT細胞を用いて、UVが誘導する皮膚細胞死に関する研究が行われてきた。Saviniらは、アスコルビン酸がUVBによるフリーラジカルの発生とアポトーシスを抑制すること [4]、Fukunagaらは、UV照射したHaCaT内のPKC δ のチロシンがリン酸化されること [5]、Villardらは、UV照射したHaCaT内のCYP1B1の転写が増加すること [6]、Guptaらは、UV照射したHaCaT内に2種の遺伝子が発現すること [7]、Fischerらは、メラトニンがUV照射したHaCaTの生存率を高めること、LiらはsilibininがUV照射したHaCaTの生存率を高めること [8]、Luoらは微粒化したトコフェロールがUV照射したHaCaTの生存率を高めること [9]、Poquetらはヒドロキシカフェ酸がUV照射したHaCaTの生存率を高めること [10]を明らかにした。一方AitkenらはUV照射したHaCaT中のフリーラジカルをダイレクトに測定する方法を提案した [11]。

天然物によるがん、皮膚がんの予防法として効果が期待されるものとして、ビタミンがあげられる。BravermanはビタミンDとカルシウム [12]、Czeczuga-SemeniukはビタミンAの摂取が肺がんのリスクを減らすこと [13]、Jinらは、ビタミンAが肺がんのリスクを減らすこと [14]、Ishiharaらは、ビタミンB₆の摂取量が減ると直腸がんの発症率がたかまること [15]、Larssonらは、ビタミンAやレチノールが胃がんのリスクを減少すること [16]を報告している。Yeomらは、ビタミンCを過剰に投与することのより、腫瘍の充進が抑制されることを報告している [17]。ビタミンBは美容に効果的な栄養素として有名だが、健康な肌や髪の毛を作るには欠かせないだけでなく、がん予防にも効果的だとされているので、皮膚癌予防にも効果的な栄養素だと言える。ビタミンCには抗酸化作用、つまり発生した活性酸素を除去する作用が期待できるので、紫外線を浴びて発生した活性酸素を除去し、皮膚ガン予防にも効果的な栄養素である。Reichrathらは、ビタミンDが皮膚がんの予防に有効なことを報告している [18]。

上記のように、これまでビタミンA、B、C、D、Eによるがん予防が試みられてきたが、有用性は明らかではなかった。

山形県の野菜生産状況は、2006年度において野菜出荷額327億円であり、東北6県中3位であったが、青森県、福島県の1/2程度であった。野菜の出荷額の少ない県は、これまで稲作に注力してきたと推察されるが、稲作は減反政策などにより抑制されており、収入源を米から別の作物にシフトすることが求められている。

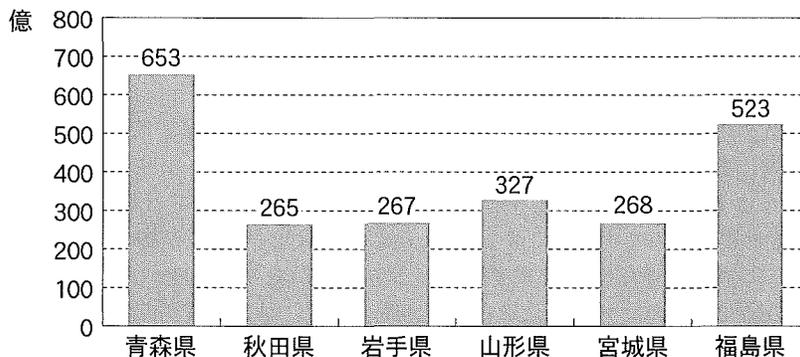


図3 東北各県の野菜出荷額 (2006年)

HaCaTはドイツのDr. P. Boukampが樹立した不死のケラチノサイト(角化細胞)である。培養皮膚細胞のひとつであるHaCaT細胞はJNK阻害剤SP600125存在下で数時間培養される

と、密着結合を新規に形成し、この際に claudin-4がリン酸化される。これまで、VEGF 発現に対するペリー抽出液の効果 (<http://www.obihiro.ac.jp/~kojima/kenkyu-shitsu/miyashita.html>) や、表皮の海綿状態の発症機序 (http://www.allergy.go.jp/Research/Shouroku_04/pdf/16_tamaki_01.pdf#search='表皮の海綿状態の発症機序 HaCaT')、また、アクネ菌の研究 (<http://www.menard.co.jp/beauty/products/academic/2009/12.html>) に HaCaT 細胞が用いられている。

本研究室では、上記の現状を鑑み、山形県特産野菜の皮膚保護作用の測定を開始した。本研究では、不死化した人皮膚細胞 HaCaT の特性を測定し、皮膚保護作用測定法を確立することを目的とした。

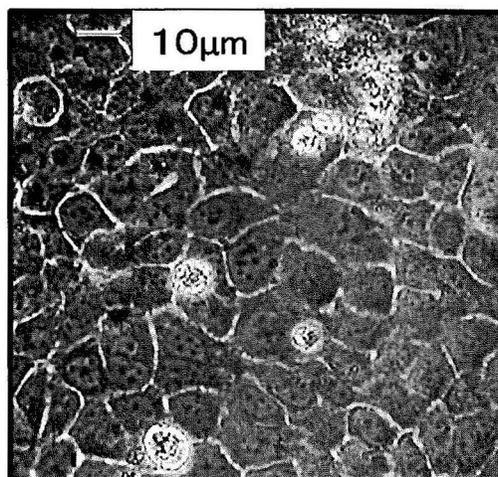


図4 HaCaT細胞

2. 実験方法

2. 1 HaCaT 細胞

HaCaT 細胞は、国立感染症研究所の木村博一博士のご好意により、分与されたものを用いた。ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) に牛胎児血清 (FBS) を10%添加し、37℃、CO₂ 5%の環境で生産した。

2. 2 HaCaT 細胞の播種

HaCaTがコンフルエントになるまで培養したカルチャーフラスコの培地を捨て、PBS 5 ml を入れ、よく洗い、捨て、PBS 5 ml、トリプシン1 ml を加えチルティングにより混合した。10分間37℃ でインキュベートし、FCSを1 ml 入れてピペッティングし、遠心管に移し4℃ 1000rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て、沈澱した細胞をほぐし、DMEM 5 ml を加えよく混ぜ、培地 (DMEM 30ml、血清 (FCS) 3 ml 入れ攪拌) に入れてピペッティングした。96穴プレートに100 μ ml ずつ分注し、残り30ml をカルチャーフラスコに入れ、CO₂ インキュベーターで培養した。

2. 3 皮膚保護作用測定法

HaCaT の生死判別に MTT 法を用いた。MTT 法は3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide を用いた細胞の生死判定法である。96穴プレートに、あらかじめ HaCaT 細胞を十分発育させ、培地100 μ l あたり、10 μ l の MTT 溶液 (5 mg/ml) を添加し、0、12、24、36時間後に分光光度計 (650nm) で吸光度を測定した。

2. 4 HaCaT 細胞が徐々に死滅する UVB 照射量の把握

100mJ/cm²~600 mJ/cm² の UVB を照射し、0、12、24、36時間後の細胞生存率を MTT 法で測定し、経時変化を測定した。

2. 5 UVB による HaCaT が死滅するメカニズムの把握

カタラーゼ阻害剤として 1 mM のアミノトリアゾール (AT)、ヒドロキシラジカル除去剤として 1% のジメチルスルホキシド (DMSO) を培地に添加して UVB を照射し、0、12、24、36 時間後の細胞の生存率を測定することにより、細胞死のメカニズムを推定した。

2. 6 HaCaT 中の脂質の抽出法

一般的なブライ・ダイヤー法で HaCaT 細胞中の脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーを用いて分析した。すなわち、100 cm² のカルチャーフラスコに HaCaT をコンフルエントになるまで培養後、すべての細胞を 200 μl の lysis Buffer に懸濁後ソニケーターで破碎した。200 μl のメタノールを加えて、ソニケート後、さらに 200 μl のクロロホルムを加えて、ソニケートした。3000rpm で 10 分間遠心分離後、下層を回収した。

2. 7 HaCaT 細胞の脂質クラス分析

HaCaT 脂質と 9 種類の標準品 [ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、セラミド (CM)、スフィンゴミエリン (SM)、カルジオリピン (CL)、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P)] を分析し、HaCaT 内にどのような脂質が存在するか推定した。分析は、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて行った。TLC プレートはシリカゲル F₂₅₄ (メルク社製) を用いた。クロロホルム：メタノール：28%アンモニア=60：30：8 (容積比) を展開溶媒とした。発色剤として、すべての有機物を発色させるリン酸硫酸銅混合液 (硫酸銅 3 g を 15% リン酸水溶液 100ml 溶かした)、アミンを発色させるニンヒドリン溶液 (ニンヒドリン 0.3g を アセトン：水=50：50 100ml で溶解)、リンを発色させるディットマー試薬 [25N 硫酸 200ml に三酸化モリブデン 8.02 g を静かに煮沸しながら溶かし (A 液)、A 液 100ml と粉末モリブデン 0.35 g を加え、15 分間静かに煮沸し、放冷した後、上澄みをデカンテーションで分けとった (B 液)。等量の A 液と B 液とを混ぜ、混合液の 2 倍量の水に溶かした。] を用いた。

3. 結果

3. 1 細胞数と紫外吸収の関係

吸光度と細胞数の関係を図 5 に示した。細胞数の増加に伴い、650 nm における吸光度が指数的に増大することが分かった。図 5 の結果から

$$\text{吸光度 (650nm)} = 0.2278e^{\text{細胞数} \times 10^{-7}}$$

であることが判明した。

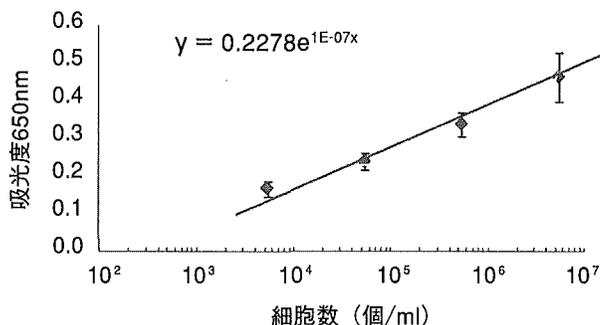


図 5 MTT法における細胞数と吸光度の関係

3. 2 UVB 照射量と HaCaT 細胞生存率の関係

100~600 mJ/cm² の UVB を照射した時の HaCaT 生存率の経時変化を図 6 に示した。UVB を 100 または 200 mJ/cm² 照射すると HaCaT の生存率が UVB 未照射の場合よりも高くなったが、原因は不明である。

UVB を 300 mJ/cm² 照射した場合は、UVB 未照射の場合と生存率は同等であったが、400 mJ/cm² 照射することにより、HaCaT が経時的に死滅することが分かった。一方、UVB 500mJ/cm² 以上照射すると HaCaT が12時間以内に急激に死滅した。以上の結果から、皮膚保護作用をアッセイする際の UVB 照射量は400 mJ/cm² が適切であると判断した。

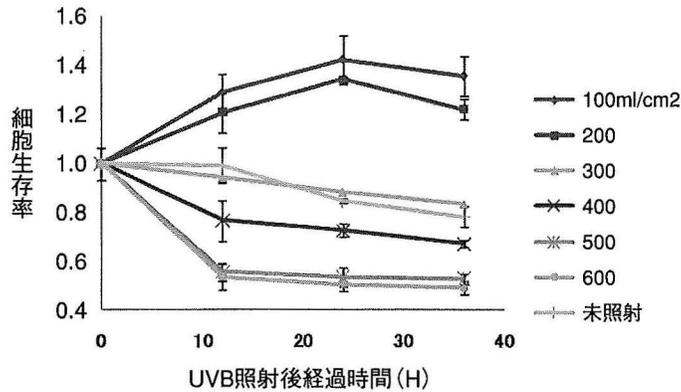


図 6 UVB照射量と生存率の関係

3. 3 アミノトリアゾール (AT) またはジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した時の HaCaT 生存率の変化

AT (カタラーゼ阻害剤) を 1 mM 培地に添加することにより、UVB 照射による HaCaT の死滅速度が有意ではないが速くなった (図 7 参照)。また、DMSO (ヒドロキシラジカル除去剤) を培地に添加することにより、UVB 照射による HaCaT の死滅が抑制された。以上の結果から UVB 照射により HaCaT 中に過酸化水素が発生し、ヒドロキシラジカルに変換され、細胞死が引き起こされると推定した。

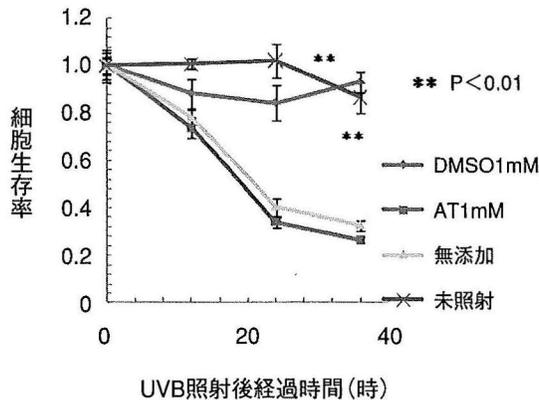


図 7 UVBでHaCaTが死滅するメカニズムの推定

4. HaCaT 中の脂質組成の把握

HaCaT 脂質の TLC 分析結果を図 8 に示した。

ニンヒドリン発色では、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンに反応し、赤く発色した。Rf 値の比較により、HaCaT 中にはホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリンが認められた。

モリブデン発色では、ホスファチジン酸、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、セラミド、スフィンゴミエリンに反応し、青く発色した。Rf 値を比較して、HaCaT 中にはホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、微量ではあるが、セラミドが認められた。

以上から、HaCaT 中には、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルセリン (PS)、スフィンゴミエリン (SM)、そして微量のセラミド (CMH) が存在することが分かった。(図 8)

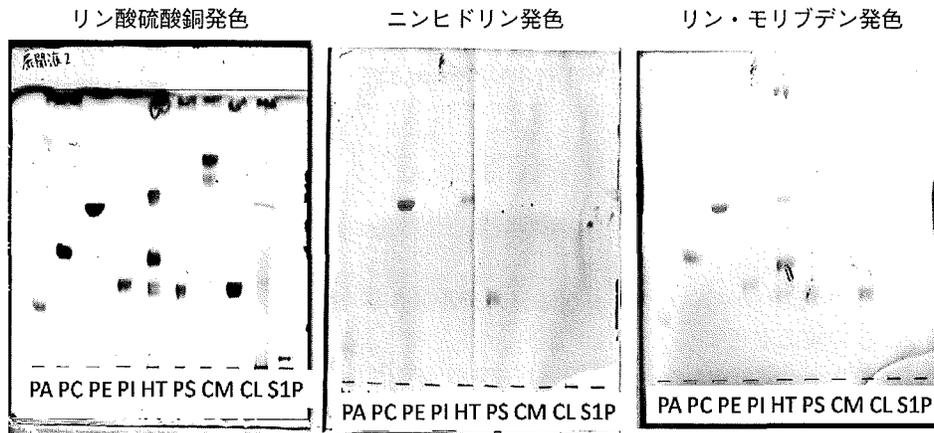


図 8 HaCaT中の脂質クラス分析結果

PA: ホスファチジン酸、PC: ホスファチジルコリン、PE: ホスファチジルエタノールアミン、PI: ホスファチジルイノシトール、HT: HaCaT 脂質、PS: ホスファチジルセリン、CM: セラミド、CL: カルディオリピン、S1P: スフィンゴシン-1-リン酸

4. 考察

図 5 から細胞数と紫外吸収が指数関係であることが分かった。図 5 から、細胞数が $10^3 \sim 10^7$ 個/mlの範囲で、吸光度から細胞数が算出できることが分かった。

図 6 から 400 mJ/cm^2 の照射量が皮膚保護作用測定に適していることが分かった。一方、 100 または 200 mJ/cm^2 照射した場合は未照射よりも細胞数が増加した。少量のUVBにより、細胞数が増加する原因究明は今後の課題とした。

図 7 より、HaCaT にUVBを照射すると、先ず過酸化水素が発生し、ヒドロキシラジカルに変換され、細胞死が引き起こされると推定した。線維芽細胞も同じメカニズムでUVB照射による細胞障害が起こることが知られており [19]、本研究で確立したアッセイ法で得られた結果は、実際の皮膚細胞に近似の作用である可能性が示唆された。UVBによる皮膚細胞障害に関する最新の研究結果 [20] によれば、UVBにより、細胞内のマップチナーゼ (MAPK)

が活性化されるとともに、EGF 受容体が核内に移動することが引き金になって細胞死を誘導する。別の文献 [21] では、スフィンゴシン-1-リン酸が誘導する MAPK が UVB 照射による細胞死を抑制することを報告している。UVB による細胞障害のメカニズムについては次年度に検討することとした。

HaCaT 中の脂質クラス分析から、HaCaT 中には PC、PE、PS、SM そして微量 CMH が存在することがわかった。CMH は、皮膚のバリア機能と保湿機能を司る脂質であり、UVB を受けることにより、CMH の増減に関しても測定を行う予定である。

5. まとめ

近年、フロンガスの排出量が増加するとともに大気上層のオゾンが減少し、地上に達する紫外線が増加しつつある。紫外線の増加と皮膚がんの発症は相関することがわかっており、できれば天然物で、紫外線による皮膚細胞障害に対応する素材が求められている。

一方、行者菜は山形県長井市近郊で作られるようになった野菜で、予備実験により抽出物に皮膚保護作用が認められた。

本研究では、皮膚保護作用のアッセイ系を確立することを目的として、人皮膚ケラチノサイト (HaCaT 細胞) の特性を測定した。結果、次の①～④が明らかになった。① MTT 法による吸光度と細胞数の関係を求めた。② 皮膚保護作用を測定する際に適正な UVB 照射量を求めた。③ カタラーゼ抑制剤と、ヒドロキシラジカル除去剤を用いた実験を行った結果、UVB により HaCaT 中で過酸化水素が発生し、ヒドロキシラジカルに変換することにより細胞障害が引き起こされると推定した。④ HaCaT 中の脂質クラス分析により HaCaT 中には PC、PE、PS、SM そして微量 CMH が存在していることがわかった。

6. 参考文献

- [1] M.L. Stock, M. Gerrard, F.X. Gibbons, J.L. Dykstra, H.I. Mahler, L.A. Walsh, and J.A. Kulik, Sun protection intervention for highway workers: long-term efficacy of UV photography and skin cancer information on men's protective cognitions and behavior. *Ann Behav Med* 38 (2009) 225-36.
- [2] I. Medhaug, J.A. Olseth, and J. Reuder, UV radiation and skin cancer in Norway. *J Photochem Photobiol B* 96 (2009) 232-41.
- [3] M.J. Mabruk, L.K. Toh, M. Murphy, M. Leader, E. Kay, and G.M. Murphy, Investigation of the effect of UV irradiation on DNA damage: comparison between skin cancer patients and normal volunteers. *J Cutan Pathol* 36 (2009) 760-5.
- [4] G.R. Aitken, J.R. Henderson, S.C. Chang, C.J. McNeil, and M.A. Birch-Machin, Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clin Exp Dermatol* 32 (2007) 722-7.
- [5] T.W. Fischer, B. Zbytek, R.M. Sayre, E.O. Apostolov, A.G. Basnakian, T.W. Sweatman, J. Wortsman, P. Elsner, and A. Slominski, Melatonin increases survival of HaCaT keratinocytes by suppressing UV-induced apoptosis. *J Pineal Res* 40 (2006) 18-26.
- [6] M. Fukunaga, M. Oka, M. Ichihashi, T. Yamamoto, H. Matsuzaki, and U. Kikkawa, UV-induced tyrosine phosphorylation of PKC delta and promotion of apoptosis in the HaCaT cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 289 (2001) 573-9.
- [7] N. Gupta, G. Raman, and G. Banerjee, Cloning and Identification of Two Unique Genes Involved in UV Induced Apoptosis on Human Keratinocyte (HaCaT) Cell Line. *Toxicol Mech Methods* 14 (2004) 355-9.

- [8] D. Luo, X.F. Lin, W. Min, Q.H. Ma, N. Gu, S.L. Jin, and D.G. Wang, Photoprotection by tocopherol submicron emulsion against UV-mediated damage in HaCaT cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **29** (2007) 185-9.
- [9] I. Savini, I. D'Angelo, M. Ranalli, G. Melino, and L. Avigliano, Ascorbic acid maintenance in HaCaT cells prevents radical formation and apoptosis by UV-B. *Free Radic Biol Med* **26** (1999) 1172-80.
- [10] M. Seifert, W. Tilgen, and J. Reichrath, Expression of 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase (1alphaOHase, CYP27B1) splice variants in HaCaT keratinocytes and other skin cells: modulation by culture conditions and UV-B treatment in vitro. *Anticancer Res* **29** (2009) 3659-67.
- [11] L. Poquet, M.N. Clifford, and G. Williamson, Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. *Arch Biochem Biophys* **476** (2008) 196-204.
- [12] A.S. Braverman, Evidence that high calcium and vitamin D intake decrease the risk of breast cancer in premenopausal women: implications for breast cancer prevention and screening. *South Med J* **100** (2007) 1061-2.
- [13] E. Czczuga-Semeniuk, K. Jarzabek, D. Lemancewicz, and S. Wolczynski, The vitamin A family can significantly decrease the expression of ERbeta of ERs positive breast cancer cells in the presence or absence of ER ligands and paclitaxel. *Gynecol Endocrinol* **25** (2009) 287-93.
- [14] Y.R. Jin, M.S. Lee, J.H. Lee, H.K. Hsu, J.Y. Lu, S.S. Chao, K.T. Chen, S.H. Liou, and L.P. Ger, Intake of vitamin A-rich foods and lung cancer risk in Taiwan: with special reference to garland chrysanthemum and sweet potato leaf consumption. *Asia Pac J Clin Nutr* **16** (2007) 477-88.
- [15] J. Ishihara, T. Otani, M. Inoue, M. Iwasaki, S. Sasazuki, and S. Tsugane, Low intake of vitamin B-6 is associated with increased risk of colorectal cancer in Japanese men. *J Nutr* **137** (2007) 1808-14.
- [16] S.C. Larsson, L. Bergkvist, I. Naslund, J. Rutegard, and A. Wolk, Vitamin A, retinol, and carotenoids and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* **85** (2007) 497-503.
- [17] C.H. Yeom, G. Lee, J.H. Park, J. Yu, S. Park, S.Y. Yi, H.R. Lee, Y.S. Hong, J. Yang, and S. Lee, High dose concentration administration of ascorbic acid inhibits tumor growth in BALB/C mice implanted with sarcoma 180 cancer cells via the restriction of angiogenesis. *J Transl Med* **7** (2009) 70.
- [18] J. Reichrath, Sunlight, skin cancer and vitamin D: What are the conclusions of recent findings that protection against solar ultraviolet (UV) radiation causes 25-hydroxyvitamin D deficiency in solid organ-transplant recipients, xeroderma pigmentosum, and other risk groups? *J Steroid Biochem Mol Biol* **103** (2007) 664-7.
- [19] 芋川玄爾監修、機能性化粧品素材開発のための実験法、p121、CMC 出版 (2007)
- [20] John F. Foley: UVB Signaling The Arylhydrocarbon Receptor Sees the Light , *Sci. STKE*, 29 May 2007 Vol.2007, Issue 388, p. tw182
- [21] Kim, Dong-seok; kim, Sook-Young; Lee, Jai-Eun; Kwon, sun-bang; Joo, Young-Hyun; Youn, Sang-Woong; Park, Kyoung-Chan : Sphingosine-1-phosphate-induced ERK activation protects human melanocytes from UVB-induced apoptosis. *Archives of Pharmacol Research* **26** (2003) 739-46.

要旨

フロンガスの増加により、オゾンが減少するとともに地上に到達する紫外線量が増えている。紫外線量の増加は皮膚ガンと相関があると言われており、安全性の高い、できれば天然の皮膚保護作用を有する素材が求められている。

HaCaT はドイツの Dr. P. Boukamp が樹立した不死のケラチノサイト（角化細胞）である。我々は山形県産の食用種物の皮膚保護作用を測定するために、HaCaT の成分、特性などについて測定を行い、アッセイ法の確立に必要な情報を収集した。

① UVB 照射量と HaCaT の生存率の関係を測定した結果、UVB を $400\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射することにより、24 時間後の HaCaT 生存率は 60% に減少することがわかった。② HaCaT の脂質クラス分析を行った結果、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、そして微量のセラミドが検出された。③ HaCaT の UVB 照射による細胞死がアミノトリアゾールにより亢進し、DMSO により緩和されたことから UVB により HaCaT の中で過酸化水素が発生し、ヒドロキシラジカルに変換されて細胞障害が引き起こされたと推定した。

SUMMARY

Ozone decreases with an increase of fluorocarbon, and the amount of ultraviolet rays that reaches the ground has increased as a result. It is reported that an increase of the amount of ultraviolet rays correlate with an increase in the skin cancer. Therefore, natural and safety skin protection materials are requested.

HaCaT cells are immortal keratinocyte which Dr.P.Boukamp of Germany is established. We studied the components and the characteristic of HaCaT cells for the establishment of a assay method to evaluate the skin protection activity of vegetables from Yamagata Prefecture.

The relation between HaCaT cells survival and the amount of the UVB irradiation was measured. By irradiation of $400\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB, the survival rate of HaCaT cells after 24 hours from irradiation decreased to 60%. The phosphatidylethanolamine, the phosphatidylcholine, the phosphatidyl serine, the sphingomyelin, and a small amount of ceramide were detected as a result of lipid analysis in HaCaT cells. The cell death by the UVB irradiation of HaCaT cells was promoted by aminotriazole but suppressed by DMSO. Therefore, it was assumed that hydrogen peroxide was generated by UVB and it converted to hydroxy radical, as a result, disorder of HaCaT cells was caused.