

表皮細胞に対する機械的刺激の作用

東京大学医学部附属病院 皮膚科

小 宮 根 真 弓

Human skin is exposed to outer environment, which always suffers from outer stimuli. Mechanical stimulus is one of such stimuli, which could be the most frequent stimulus affecting skin, however, the effect of mechanical stimulus on human skin has not been adequately investigated. In order to clarify the effects of mechanical stimuli on human epidermis, we employed the equipment that utilized in the investigation of cardiac muscles, and stimulated keratinocytes by stretching cells. Mechanical stretch induced BrdU incorporation, which was inhibited by inhibitors for EGF receptor, MEK1/2, PI3K, and calcium channel. Mechanical stretch induced ERK phosphorylation, which was also inhibited by inhibitors for EGF receptor phosphorylation, MEK1/2 and PI3K. Mechanical stretch induced phosphorylation of Akt, which is known to inhibit cellular apoptosis, and it was also dependent on MEK1/2, PI3K, and EGF receptor. DNA microarray experiment revealed a set of genes regulated by mechanical stretch. These results indicate that mechanical stretch causes activation of signaling molecules, resulting in regulation of a variety of gene expression, some of which induce proliferative and anti-apoptotic phenotype in keratinocytes.

1. 緒 言

表皮は、人を構成する組織の一番外側にあつて、常に外的環境の影響を受けている。外的環境因子として、熱、光、化学物質などがあるが、機械的刺激も重要な外的刺激因子である。機械的刺激が実際に皮膚にどのように作用しているかを考えると、たとえば強度の外力は皮膚の外傷の原因となり、また軽度の外力は皮膚の掻破、マッサージ、スクラブ洗顔などの際に皮膚に加えられると考えられる。さらに、ティッシュエクステンダーによる皮膚の伸展、急激な肥満や妊娠による皮膚の伸展といった現象も皮膚に加わる機械的刺激である。このように、機械的刺激は、日常的に皮膚に影響を及ぼしていると考えられるが、機械的刺激が表皮に与える影響については、ほとんど研究が行われていない。我々は、本研究において、機械的刺激が表皮細胞にどのような影響を与えるのかを、Vitroの実験系を構築し、検討した。さらに、機械的刺激の遺伝子発現への作用を、DNAアレイを用いて網羅的に検討した。

2. 実 験

1) 抗体と試薬

抗体に関しては anti phospho-ERK1/2, anti phospho-Akt (Ser 473), anti Akt は Cell Signaling (Beverly, USA) から、anti PCNA, anti ERK2, anti EGFR, anti

phosphotyrosine (PY-20), anti mouse IgG HRP conjugate, anti rabbit IgG HRP conjugate は Santa Cruz (Santa Cruz, USA) から、anti phospho-EGFR antibody は Calbiochem (San Diego, CA) から購入した。試薬については MEK inhibitor U0126 は Promega (Madison, USA) より、PI-3 kinase inhibitor wortmannin, EGFR kinase inhibitor AG1478 と negative control SB202474 は Calbiochem より購入した。

2) 表皮角化細胞の培養

正常ヒト新生児表皮角化細胞 (NHK) のプライマリーカルチャーは岩城硝子より購入し、KBM (keratinocyte basal medium) にハイドロコーチゾン、インスリン、甲状腺ホルモン、ウシ下垂体抽出物 (BPE) と EGF を加えた KGM (keratinocyte growth medium, keratinocyte-SFM, GIBCO) で培養した。表皮細胞が 70 - 80% コンフルエントになったところで、トリプシン処理し、底面積比 1 : 4 で、継代培養した。3 - 4 回継代したものを実験に用いた。

HaCaT 細胞は Deutsches Kresforschungszentrum, Fusenig 教授より許可を得、昭和大学黒木登志夫先生より供与されたものを、10% ウシ血清 (FBS) を加えた MEM (modified Eagle's medium) で培養し、70 - 80% コンフルエントになったところで、トリプシン処理し、底面積比 1 : 10 で、継代培養した。

これらの細胞はすべて、37℃、5% CO₂ 下のインキュベーター内で培養した。

3) シリコン製培養皿上での細胞培養

伸縮可能なシリコン製の培養皿 (内空部分 4 × 2 × 1 cm、底面積 8 cm²、太陽興業社製) をオートクレーブした後、



The effects of mechanical stretch on keratinocytes

Mayumi Komine

Department of Dermatology, University of Tokyo

その底面をタイプ I コラーゲン (Sigma) にてコーティングし (0.02mg/個)、その後 NHK ないし HaCaT を 1×10^5 cells/cm² の密度にて播種し、37℃、5% CO₂ 下にて培養した。シリコンを伸展させるためにはステンレス製のチャンパー (東和科学、東京) にシリコン培養皿を装着して引き伸ばして固定する、という方法で +10、+20、+30% の長軸方向の伸展を持続的に可能とした。伸展前と +20% 伸展後の状態とを (図 1) に示した。

4) BrdU アッセイ

正常ヒト表皮細胞および HaCaT 細胞を 20% 伸展刺激を加え 24 時間培養した。最後の 3 時間を 100μM の BrdU でパルスし、スクレーパーを用いて細胞を PBS に回収したものを 96 ウェルプレートに播種して遠心した。乾いた 96 ウェルプレートの BrdU 取り込みを Cell Proliferation ELISA, with a BrdU colorimetric system (Roche, Mannheim, Germany) を用いて測定した。

5) ウェスタンブロット法

NHK および HaCaT 細胞からの蛋白抽出およびウェスタンブロットは、以下のように行った。リン酸化 ERK、リン酸化 EGF、リン酸化 Akt の検出には、Lysis buffer として RIPA buffer (20mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM b-glycerophosphate, 1mM sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 1mg/ml leupeptin) を用いた。

抽出した蛋白はサンプルバッファー [50mM Tris (pH7.4) / 0.14 % sodium dodecyl sulfate (SDS) / 1 % b-mercaptoethanol (vol/vol)] 中で煮沸し、12.5 % SDS polyacrylamide gel を用いて電気泳動した。PVDF 膜 (Immobilon-P) に転写した後、膜はブロッキングバッファー [5 % BSA in 25mM Tris/0.02% KCl/0.8% NaCl (pH7.4)] で 4℃ 2 - 8 時間インキュベーションし、抗ヒトケラチンモノクローナル抗体、あるいは抗リン酸化 ERK、抗リン酸化 Akt、抗リン酸化 EGFR と 4℃ 16 時間インキュベーションした。膜は洗浄後、二次抗体と 1 時間反応させ、化学蛍光抗体法にて発色させた。PVDF 膜はストリッピングバッファーにてストリッピング後、抗 ERK、抗 AKT、抗

EGFR 抗体とともに 4℃ 16 時間インキュベートして上記と同様に再度ウェスタンブロットを行った。

6) DNA アレイ

表皮細胞を 4 時間、16 時間、24 時間、48 時間ストレッチ後、ストレッチしない表皮細胞と同時に、キアゲン社の RNA 抽出キットにて RNA を抽出し、Affymetrix 社の DNA マイクロアレイチップを用いて、ストレッチの有無による遺伝子発現の差異を検討した。

3. 結 果

1) 表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、BrdU 取り込みが促進する。

表皮細胞を 20%、24 時間伸展することにより、BrdU 取り込みは、正常ヒト表皮細胞で 2.2 ± 0.4 倍、HaCaT 細胞で 2.0 ± 0.5 倍に上昇し、これは統計学的に有意であった ($p < 0.05$)。また、この BrdU 取り込みの上昇は、MEK1/2 阻害剤である U0126 (10μM)、PI3Kinase 阻害剤である Wortmannin (1μM)、EGF 受容体阻害剤である AG1478 (200 nM)、カルシウムチャネル阻害剤である Gadolinium (150μM) にて抑制された (図 2)。

以上の結果は、伸展刺激は表皮細胞の増殖能を上昇させ、その伸展刺激による BrdU 取り込みの増加は、ERK、PI3K、EGF 受容体、カルシウムチャネルに依存していることを示している。

2) 表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、ERK がリン酸化する。

表皮細胞に伸展刺激を加え、1 分後、2 分後、5 分後、15 分後、30 分後、60 分後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法にてリン酸化 ERK を検出したところ、伸展刺激により 2 分後より ERK のリン酸化が認められ、5 分後、15 分後にピークとなり、30 分後、60 分後と次第に減少していくのが確認された。このメンブレンを再度抗 ERK 抗体にてプロットしなおし、ERK の蛋白レベルの変化を検討したところ、図に示すように ERK の蛋白レベルはほぼ

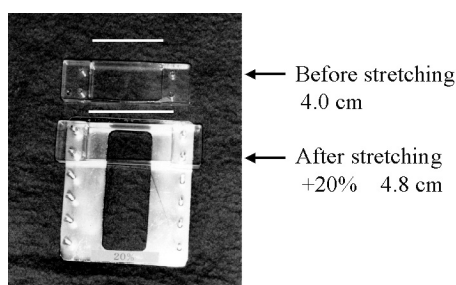


図 1

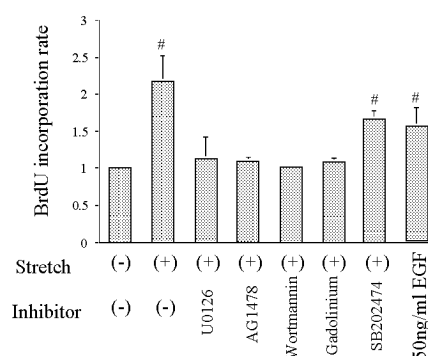


図 2

一定であった (図3)。

3) 伸展刺激による ERK リン酸化は U0126、Wortmannin により阻害される。

表皮細胞に伸展刺激を加える 1 時間前に、MEK1/2 阻害剤である U0126、および PI3K 阻害剤である Wortmannin を加え、伸展後、前述のように細胞を回収し、ウェスタンブロット法にて ERK のリン酸化を検出したところ、伸展刺激による ERK のリン酸化は U0126、Wortmannin によって阻害された。一方、陽性コントロールとして用いた EGF 刺激による ERK リン酸化は、U0126 により抑制されたが、Wortmannin によっては抑制されなかった (図4)。すなわち、伸展刺激による ERK リン酸化は、MEK1/2 および PI3K の下流にあると考えられる。

4) 伸展刺激による ERK リン酸化は、Gadolinium および AG1478 により阻害される。

伸展刺激 1 時間前よりカルシウムチャネル阻害剤である Gadolinium あるいは EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤である AG1478 を加え、伸展後、前述の如く細胞を回収し、ウェスタンブロット法にて ERK のリン酸化を検出した。伸展刺激による ERK リン酸化は、Gadolinium あるいは AG1478 により濃度依存的に抑制された (図5 a,b)。EGF による ERK リン酸化は Gadolinium では抑制されなかったが、AG1478 によって抑制された。したがって、伸展刺激による ERK リン酸化は EGF 受容体およびカルシウムチャネルの下流にあると考えられる。

5) 伸展刺激は AKT をリン酸化する。

伸展刺激による BrdU の取り込みに PI3K が関与していることから、細胞のアポトーシス抑制的に働き、PI3K の

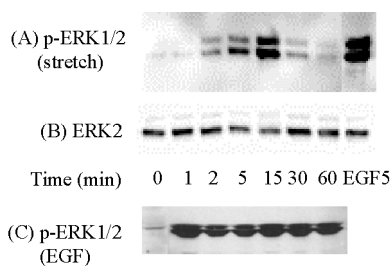


図 3

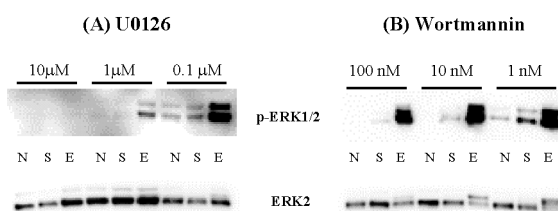


図 4

下流にあると考えられる Akt のリン酸化を検討した。伸展刺激により 5 分後、15 分後、30 分後に Akt のリン酸化が確認された (図6)。

6) 伸展刺激による AKT リン酸化は、MEK1/2 依存적である。

伸展刺激による Akt リン酸化に MEK1/2 が関与するかどうかを検討するため、MEK1/2 阻害剤である U0126 を伸展刺激 1 時間前より加えたところ、伸展刺激による Akt リン酸化は U0126 により抑制された。すなわち、伸展刺激による Akt リン酸化は MEK1/2 依存적であると考えられる (図7)。

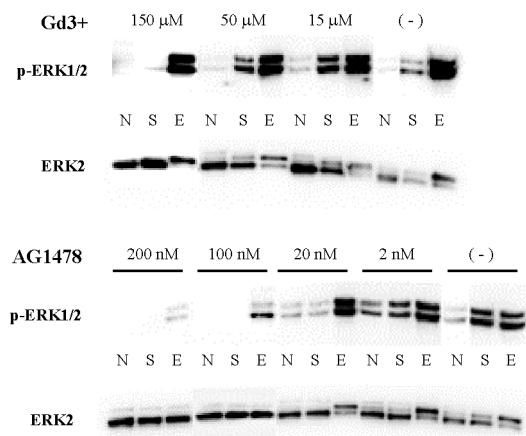


図 5

Mechanical stretch phosphorylated Akt in keratinocytes

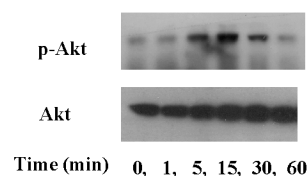
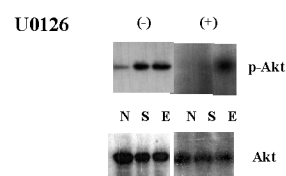


図 6

U0126, the MEK inhibitor, inhibited phosphorylation of Akt by mechanical stretch



N=no stretch, S=stretch for 15 minutes, E=EGF (50ng/ml) stimulation for 15 minutes

図 7

7) 伸展刺激による AKT リン酸化は、PI3K 依存的である。

PI3K が、伸展刺激による Akt リン酸化の上流にあるかを検討するため、PI3K 阻害剤である Wortmannin を加え、伸展刺激による Akt リン酸化を見たところ、Wortmannin により、伸展刺激による Akt リン酸化が抑制された。すなわち、伸展刺激による Akt リン酸化は PI3K の下流にあると考えられる (図8)。

8) 伸展刺激による Akt リン酸化は、EGF 受容体の下流にある。

伸展刺激による Akt リン酸化に、EGF 受容体が関与しているか否かを検討するため、EGF 受容体リン酸化阻害剤である AG1478 を加えたところ、伸展刺激による Akt リン酸化は抑制された。したがって、伸展刺激による Akt リン酸化は EGF 受容体の活性化に依存していると考えられる (図9)。

9) DNA マイクロアレイによる伸展刺激の遺伝子発現に対する作用

DNA マイクロアレイ法は、同時に多数の遺伝子発現調節を検討するのに大変優れた方法である。伸展刺激によ

てどのような遺伝子の発現が調節されているのかを広範囲に検討するため、Affymetrix 社の DNA チップを用いて、12000 個の遺伝子について、伸展刺激による発現調節の有無を検討した。ここではその一部を示す (図10)。基底細胞に発現の認められるラミニン 5 の 3 つの構成分子 (laminin alpha 3, beta 3, gamma 2)、Bullous pemphigoid antigen 1、Integrin alpha 6 の発現が伸展刺激により誘導され、分化した表皮細胞に発現の認められる Filaggrin、Loricrin、Keratin 1、Keratin 9 の発現は抑制されていた。このうち、ラミニンの 3 つの構成分子についてウェスタンブロットにて蛋白レベルでの発現を検討したところ、図11に示すように、alpha 3、beta3 の発現は伸展刺激により誘導されたが、gamma 2 の発現にはあまり変化が認められなかった。

Markers of basal and proliferating keratinocyte

• Laminin alpha 3 chain	0.70	1.50	2.49
• Laminin beta 3 chain	0.85	1.89	2.12
• Laminin gamma 2 chain	0.83	2.23	2.12
• Bullous pemphigoid antigen 1	2.32	0.72	0.68
• Integrin alpha 6	0.69	2.36	1.41
• Keratin 15	0.97	0.30	1.96
• Keratin 6A	2.04	0.76	0.41

4h 18h 48h

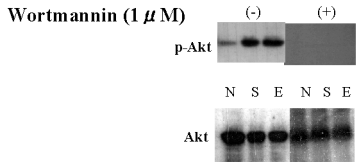
図 10a

Markers of differentiating keratinocyte

• Keratin 1	0.51	0.24	0.51
• Keratin 9	1.61	0.64	0.55
• Filaggrin	0.99	0.16	0.08
• Loricrin	0.70	0.55	0.64

図 10b

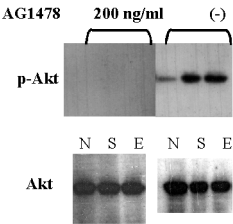
Wortmannin, the PI3K inhibitor, inhibited phosphorylation of Akt by mechanical stretch



N=No stimulation, S=Stretch for 15 minutes, E=EGF (50ng/ml) stimulation for 15 minutes

図 8

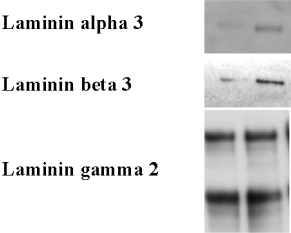
AG1478, the EGFR tyrosin kinase inhibitor, inhibited phosphorylation of Akt by mechanical stretch



N=No stimulation, S=Stretch for 15 minutes, E=EGF (50ng/ml) stimulation for 15 minutes

図 9

Induction of laminin 5 subunits by mechanical stretch



Stretch (-) (+) 24 hours

図 11

4. 考 察

皮膚は体表を多い、外界からの機械的刺激を最も直接に受ける可能性が高い臓器であるが、皮膚に対する機械的刺激についての検討は、現在のところあまり行われていない。今回我々は、皮膚、特に表皮細胞に対して、伸展という機械的刺激が加えられたときに、どのような変化が引き起こされるかを解明するために、実験を行った。今回は、伸展可能なシリコンチャンバーに表皮細胞を播種して伸展刺激を加えた。この方法は、小室らの報告¹⁾に準じたものである。このような伸展刺激が実際にどのような場面で皮膚に与えられるのかは一考を要するが、おそらく搔破によって、表皮に伸展刺激が加わると考えられる。ティッシュエクspanderで皮膚を伸展させる場合や、表皮内腫瘍の増殖に伴い、表皮細胞が伸展される場合にも、やはり同様な伸展刺激が加わるものと考えられる。さらに、洗顔の際に皮膚を強くこすったり、フェイシャルブラシによる皮膚の刺激の際にも、同様な伸展刺激が表皮に加わる可能性がある。

伸展刺激により、まず表皮細胞に増殖シグナルが生じることは、ティッシュエクspanderによって皮膚が伸展拡大することや、表皮内腫瘍の周辺部皮膚に増殖性変化を伴うことをよく説明できる。その際に、EGF 受容体の活性化を介していることは、血管平滑筋細胞²⁾や、血管内皮細胞³⁾など、他の細胞における機械的刺激の受容とパラレルな結果である。今回、伸展刺激により Br d U の取り込みが亢進し、さらにアポトーシス抑制的にはたらく Akt が活性化したことは、これらの事実を裏付けるものと考えられる。我々の実験により、伸展刺激による ERK のリン酸化および Akt のリン酸化の双方が、EGF 受容体、MEK1/2、PI3K の下流にあることが明らかとなった。これは、今回ポジティブコントロールとして用いた EGF による ERK のリン酸化が MEK1/2 下流にあるが、PI3K の下流にはないことを考えると、伸展刺激による EGF 受容体の活性化が、EGF による EGF 受容体の活性化とは異なったアウトカムを生じることを示しており、興味深い。ドイツのグループ⁴⁾は、同様の伸展刺激システムを用いて表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、ERK がリン酸化し、そのリン酸化は $\beta 1$ インテグリン中和抗体により抑

制されることを示している。 $\beta 1$ インテグリンおよび EGF 受容体はともに細胞膜上にあり、ともに伸展刺激にかかわることから、これらが細胞膜上でなんらかの相互作用を引き起こしている可能性が考えられる。伸展刺激がどのようにしてこれらの分子を刺激するのか、あるいは $\beta 1$ インテグリンと EGF 受容体がどのように相互作用を起こすのかは不明であり、今後の検討課題である。また、DNA マイクロアレイにより、多数の遺伝子発現が機械的刺激により影響を受けることが明らかとなり、その一部として、細胞外マトリックス産生、増殖促進、分化抑制など、より基底層の細胞に近い形質を誘導することがわかった。今後は表皮細胞の構築を正常に維持する上での機械的刺激の意義を検討していきたいと考えている。

(参考文献)

- 1) Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y, :Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation, J Biol Chem, 266, 1265-1268, 1991.
- 2) Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y, :Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 278, H521-H529, 2000.
- 3) Tseng H, Peterson TE, Berk BC, :Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells, Circ Res, 77, 869-878, 1995.
- 4) Kippenberger S, Bernd A, Loitsch S, Guschel M, Muller J, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, : Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases. J Invest Dermatol, 114, 408-412, 2000.
- 5) Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K, :Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol, 122, 783-90, 2004.