UVA, UVB による炎症のメディエーター

近藤 靖児*

Inflammatory mediators induced by UVA and UVB

Keratinocytes(KC)produce proinflammatory cytokines and prostaglandin E_2 (PGE_2)leading to the skin inflammation induced by ultraviolet radiation(UVR). UVR-induced inflammation, sunburn, is mainly induced by UVB, but UVA is known to augment its reaction. In order to find if this augmentative effect of UVA is due to the effect of UVA on KC to induce proinflammatory mediators including cytokines and PGE_2 , normal human KC were cultured and irradiated by UVB and UVA either separately or concomitantly. Levels of mRNA for each cytokine were determined by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)method and protein production in cultured supernatants was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)or enzyme immunoassay(EIA). UVB(300 J/m²)induced the expression of IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β 1 and GM-CSF mRNA at 24 h after irradiation, while an increase only in IL-6 and IL-8 mRNA levels was observed at 24 h after UVA irradiation(10 kJ/m²). IL-1 α , IL-6, IL-8 and PGE_2 production was increased augmentatively by UVB and UVA, but significant levels of TNF- α , TGF- β 1 and GM-CSF protein in cultured supernatants were detected only after UVB irradiation. These results indicate that UVB and UVA differentially regulate the expression and production of KC-derived cytokines and UVA is able to induce proinflammatory mediators from KC additively to UVB. Our results explain the mechanism by which UVA augments UVB-induced skin inflammation.

Rec. 9/10/1999, Acc. 10/15/1999, pp 45~50

Seiji Kondo*

key words : cytokine, prostaglandin E_2 , ultraviolet light, keratinocytes

地球上に到達する紫外線はその波長により、中波長紫外線(UVB)と長波長紫外線(UVA)とに分けられるが、紫外線が生体に及ぼす影響、たとえば皮膚の日焼け紅斑に代表される炎症反応、老化促進、白内障の誘発、免疫抑制、さらに皮膚癌形成などは主に UVB によって引き起こされている。

皮膚の角化細胞であるケラチノサイト(KC)は紫外線に暴露されるとさまざまな生理活性物質を産生、放出して、紫外線により惹起される皮膚の炎症反応における種々の過程を調節している。こ

れらの物質のうち、 PGE_2 は炎症の初期反応として認められる血管拡張に関与しており、炎症性サイトカインは血管内皮細胞に細胞接着因子の発現を誘導し、好中球、リンパ球の遊走を調節し、引き続いて起こる炎症細胞の浸潤に関与している。さらにこの紫外線紅斑は24時間をピークとして次第に消退していくが、この過程にもいわゆる免疫抑制性、または炎症を抑える働きを有するサイトカインが関与している¹⁾。

UVB による KC からのサイトカイン、 PGE_2 の産生調節についてはこれまでに多くのことが明らかにされている。一方 UVA の生物学的な作用は、UVB に比してきわめて小さいため、UVB の生体に及ぼす作用にどのように関与するかについてを中心に研究されてきた。その結果、紅斑反応や発癌の過程に、UVA は UVB の効果を増強させる

* Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Sapporo Medical University 札幌医科大学皮膚科学教室

Offprint requests to : Seiji Kondo, Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Sapporo Medical University, S1, W 16, Chuo-ku, Sapporo, 060-8543 Japan

方向で関与することがヒトや動物実験などから確認されている^{2,3)}。しかし、UVA が実際に皮膚の炎症反応を調節している KC 由来のサイトカインや PGE₂などの産生にいかにかかわっているかについての知見は少ない。そこで、UVA の皮膚の炎症反応に及ぼす影響についてさらに明らかにする目的で、正常ヒト由来の KC を用いて、UVA 照射が KC からのサイトカイン産生、PGE₂産生にどのように関与しているかについて検討した。

材料と方法

(1) KC の培養と紫外線照射

植皮術の際の残余正常皮膚を用いて、すでに確立した操作⁴⁾より KC を培養した。培養液は K-SFM(Gibco BRL, Life Technologies, Tokyo, Japan)を用いた。KC の細胞周期をなるべくあわせるために、紫外線照射 48 時間前に増殖因子 (bovine pituitary extract, recombinant epidermal growth factor) を除去した培養液に交換した。照射直前に KC を PBS で 2 回洗い、1 ml の PBS 存在下で紫外線照射を行った。照射直後に照射前の培養液 (conditioned medium) をもどして、種々の時間培養した。光源はデルマレイ (Model M-DMR-1, Eisai, Japan) の UVA 照射側に BLB ランプ 9 本と SE ランプ 1 本を装着したものを用い、照射率は UVR-305/365-D(Eisai & Torex) で測定し、305 nm で 0.65 mW/cm², 365 nm で 4.5 mW/cm²にそれぞれ設定した。この装置により、UVB, UVA をそれぞれ単独、および同時に照射することが可能である。照射一定時間後に細胞と上清をそれぞれ回収し、上清は遠沈にて細胞成分を除去後 -80°C に保存し、細胞は回収後 total RNA を抽出した⁵⁾。なお KC は 4 人の健常人皮膚からそれぞれ培養し、別々に以下の実験を行った。

(2) ELISA, EIA

サイトカイン特異的 ELISA キット、PGE₂特異的 EIA システムを用いて、培養上清中のそれぞれの濃度を triplicate で測定した。4 種類の KC についてそれぞれ 3 回ずつ照射実験を施行し、有意差の検定は Student's t-test により行った。使用したキットは以下のとおりである：IL-1 α and

TGF- β 1, Quantikine, R & D Systems, MN, USA ; IL-6 and IL-8, Toray Industries, Inc., Tokyo, Japan ; GM-CSF and TNF- α , BioSource International Inc., CA, USA ; PGE₂, Amersham Pharmacia Biotech, Tokyo, Japan.

(3) RT-PCR

Semi-quantitative RT-PCR を施行した。各サイトカインに特異的なプライマーを用い、PCR 産物は 1.5% アガロースゲル上で電気泳動を行った。半定量を行うため、あらかじめ PCR サイクル数と cDNA 量を変えて、PCR 産物が反応飽和状態になっていない条件を設定した⁶⁾。PCR は duplicate で、それぞれのサンプルについて 3 回ずつ施行した。

結果

(1) サイトカインの培養上清中の量

紫外線照射により誘導されたサイトカインの変動の傾向はほぼ同様であったが、培養上清中に検出された量には細胞間で多少のばらつきが認められたため、以下の結果では代表的なもののみ示した。UVB 照射により KC 細胞内に蓄積している IL-1 α が放出されるが⁴⁾、UVA 照射後にも培養上清中の IL-1 α レベルは上昇した。両者を同時に照射すると、相加的に IL-1 α レベルは上昇した (図 1 a)。IL-6, IL-8 も UVB, UVA それぞれ単独照射により誘導され、同時照射によりほぼ相加的に上昇した (図 1 b & c)。一方 TNF- α , TGF- β 1, GM-CSF は UVB 照射により誘導が認められたものの、UVA 単独照射後には培養上清中のこれらのサイトカインはすべて ELISA の検出限界以下であった (図 1 d)。同時照射でも UVA 照射は UVB の効果に有意な影響は認められなかった。

(2) サイトカイン mRNA

Semi-quantitative PCR を行う目的で、サイクル数と cDNA 量の検討をそれぞれのサイトカインについて行った。その結果、1 μ l の cDNA 量でそれぞれのサイクル数は IL-6, IL-8 は 32, GM-CSF, TNF- α , TGF- β 1 は 36, IL-10 は 40, G 3 PDH は 26 サイクルで PCR を行った。IL-6, IL-

图 1 Effect of UVA on UVB-induced cytokine release from human keratinocytes

The keratinocytes were cultured in incomplete K-SFM without BPE and rEGF for 48 h before irradiation. After 10 kJ/m² UVA and/or 300 J/m² UVB irradiation, the cells were cultured in the conditioned medium. The supernatants were harvested at different time points after irradiation, centrifuged and tested for cytokine activity in triplicate by the use of an ELISA. The data represents the mean±SD of three independent experiments run on triplicate supernatant samples.

a, IL-1α; b, IL-6; c, IL-8; d, TNF-α. Statistical significance was determined using a Student's t test.

图 2 Effects of UVA and UVB on the expression of cytokine mRNA in human keratinocytes

Total RNA was extracted from cultured human keratinocytes 24 and 48 h after UVA (10 kJ/m²) and/or UVB (300 J/m²) irradiation and 0.5 μg of total RNA was used for RT-PCR using primers specific for each cytokine.

m, DNA size marker; 0, sham-irradiated cells; p.c., positive control.

図3a

図3b

図3c

図3 Induction of PGE₂ from human keratinocytes by UVA and/or UVB irradiation

The keratinocytes were cultured in incomplete K-SFM without BPE and rEGF for 48 h before irradiation. After 10 kJ/m² UVA and/or 300 J/m² UVB irradiation, the cells were cultured in the conditioned medium. The supernatants were harvested at different time points after irradiation, centrifuged and tested for PGE₂ activity by the use of an EIA. The data represents the mean±SD of three independent experiments run on triplicate supernatant samples.

a, time-dependent induction of PGE₂ by UVB; b, time-dependent induction of PGE₂ by UVA; c, additive effect of UVA on UVB-induced PGE₂. Statistical significance was determined using a Student's t test.

8 の mRNA レベルは UVB, UVA とともに上昇が認められ、同時照射により、さらにそのレベルは増加した。GM-CSF, TNF- α , TGF- β 1 の mRNA レベルは UVB 照射後には上昇が認められたが、UVA 単独照射ではほとんど変化を認めなかった。IL-10 mRNA は筆者らの条件下では UVA, UVB とともに照射前、照射後ともに KC の発現は認められなかった(図 2)。

(3) PGE₂

PGE₂ レベルは EIA により測定した。照射前の定常状態でも培養上清中に PGE₂ を検出したが、UVB(300 J/m²)照射により時間依存性に PGE₂ のレベルは上昇した(図 3a)。同様に UVA 照射により、UVB 照射後に比して少量ではあるが、PGE₂ レベルの上昇が認められた(図 3b)。UVB と UVA の同時照射では、UVB 単独照射に比して PGE₂ の産生は相加的に増加していた(図 3c)。

考 察

皮膚は常に外界に接しており、そのなかでも太陽光線に含まれる紫外線への暴露はヒトが地球上で生存する限り、避けられない事象である。UVB による KC からのサイトカイン誘導については、1981 年に Luger ら⁷⁾が KC からの epidermal cell-derived thymocyte activating factor (ETAF) の産生を見出して以来数多くの報告があり、KC はサイトカインの宝庫といっても過言ではないほど多種類のサイトカインを産生・放出し、免疫に能動的にかかわっている⁴⁾。今回の検討でも、UVB 照射により、KC から IL-1 α , IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , TGF- β 1 が誘導されることを確認し、過去の報告^{4,6,8~11)}に矛盾しない結果を得た。

検討したサイトカインのうち IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α については、実際に皮膚に投与すると紅斑・浮腫が惹起され、組織学的にも炎症性細

胞浸潤が誘導される¹²⁻¹⁷⁾。PGE₂も皮膚に炎症を惹起、特に炎症の初期の血管拡張に重要な働きを果たしていることが知られている¹⁸⁾。一方 TGF- β 1, IL-10 は免疫抑制性のサイトカインであり、炎症を消退させる方向に働いているものと考えられる。したがって、これらの各因子が UVA によりどのように調節されているかについて検討することにより、UVA が紫外線炎症に果たす役割が明らかになると考えたわけである。

UVA 照射により KC からのサイトカイン誘導については過去にいくつかの報告があるが、報告により相違が認められる。IL-1 α が UVA 照射により抑制される¹⁹⁾または影響を受けない^{20,21)}という報告がある一方、筆者らが得た結果と同様に誘導を認めたとする報告^{22,23)}もある。IL-6 についても UVA では誘導されないとする報告^{8,21)}と誘導がみられたとする報告²⁰⁾とがある。これら報告による相違の理由については明らかではないが、使用した細胞、光源、照射量など実験方法の違いが影響しているものと考えられる。

特に *in vitro* で使用する紫外線量については、得られた結果から *in vivo* の現象を説明することが目標であることから慎重に設定する必要がある。筆者らが用いた紫外線量は、これまでの報告から、日中の太陽光線に含まれている UVB と UVA の量の比率がそれぞれ 0.15%, 5.6% であり、1 時間の露光量がそれぞれ 1~3 kJ/m², 60~100 kJ/m² であること、また一連の UVB を用いた実験でこれまで 300 J/m² を使用しており、この量が *in vivo* の 1 時間の露光量の約 1/10 にあたるので UVA の照射量も *in vivo* の約 1/10 である 10 kJ/m² とするのが妥当と判断したことなどから設定したものである。この UVA 量は筆者らの用いた照射条件下では 4 分未満の時間で達成でき、KC の生存率にはほとんど影響せず、さらにこの量で KC から IL-12 が誘導されることも確認している²⁴⁾。

UVB が表皮細胞から誘導するサイトカインは多種類にわたるが、今回の結果から、UVA はそのうちの proinflammatory cytokines である IL-1 α , IL-6, IL-8 および PGE₂ などを同様に誘導し、

これら炎症惹起に関連する因子については、主に相加的に作用していることが明らかとなった。換言すれば、UVA と UVB はケラチノサイトからの炎症のメディエーター放出に際して相乗的には作用しないことも意味している。このことは *in vivo* で両者が紅斑反応の誘導に際して相加的に作用するとの報告に矛盾しない。すなわち、UVA は UVB 紅斑を増強させる働きのあることが、*in vitro* において KC 由来の炎症のメディエーター誘導を確認することにより証明された。

今後は各サイトカインの特異的抗体、COX 2 抑制剤などの影響を検討することにより、それぞれの因子が紫外線炎症で果たす役割についてさらに明らかになるものと思われる。

文 献

- 1) Kondo S : The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. J Invest Dermatol Sym Proc 4 : 177-183, 1999.
- 2) Willis I, Kligman AM, Epstein JH : Effect of long ultraviolet rays on human skin : photoprotection or photoaugmentation ? J Invest Dermatol 59 : 416-420, 1972.
- 3) Willis I, Menter JM, Whyte HJ : The rapid induction of cancers in hairless mouse utilizing the principle of photoaugmentation. J Invest Dermatol 76 : 404-408, 1981.
- 4) Kondo S, Sauder DN, Kono T, Galley KA, McKenzie RC : Differential modulation of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in human keratinocytes by UVB. Exp Dermatol 3 : 29-39, 1994.
- 5) Chomczynski P, Sacchi N : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162 : 156-159, 1987.
- 6) Kondo S, Kono T, Sauder DN, McKenzie RC : IL-8 gene expression and production in human keratinocytes and their modulation by UVB. J Invest Dermatol 101 : 690-694, 1993.
- 7) Luger TA, Stadler BM, Katz SI, Oppenheim JJ : Epidermal cell (keratinocyte) derived thymocyte activating factor (ETAF). J Immunol 127 : 1493-1498, 1981.
- 8) Kirnbauer R, Köck A, Neuner P, Forster E, Krutmann J, Urbanski A, Schauer E, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA : Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. J Invest Dermatol 96 : 484-489, 1991.
- 9) Kondo S, Ciarletta A, Turner KJ, Sauder DN, McKenzie RC : Failure to detect interleukin (IL)-3 mRNA or protein in human keratinocytes : antibodies to granulocyte macrophage-colony-stimu-

- lating factor or IL-6 (but not IL-3) neutralize "IL-3" bioactivity. *J Invest Dermatol* 104 : 335-339, 1995.
- 10) Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA : Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha : evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 172 : 1609-1614, 1990.
 - 11) Lee H-ST, Kooshesh F, Sauder DN, Kondo S : Modulation of TGF- β 1 production from human keratinocytes by UVB. *Exp Dermatol* 6 : 105-110, 1997.
 - 12) Beck G, Habicht GS, Benach JL, Miller F : Interleukin 1 : a common endogenous mediator of inflammation and the local Shwartzman reaction. *J Immunol* 136 : 3025-3031, 1986.
 - 13) Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC : Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol* 18 : 717-721, 1988.
 - 14) Swensson O, Schubert C, Christophers E, Schroder JM : Inflammatory properties of neutrophil-activating protein-1/interleukin 8 (NAP-1/IL-8) in human skin : a light- and electronmicroscopic study. *J Invest Dermatol* 96 : 682-689, 1991.
 - 15) Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, Raffeld M : Neutrophil recruitment by intradermally injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J Invest Dermatol* 96 : 690-694, 1991.
 - 16) Movat HZ, Burrowes CE, Cybulsky MI, Dinarello CA : Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury. *Am J Pathol* 129 : 463-476, 1987.
 - 17) Kondo S, Sauder DN : Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p 55) is a main mediator for TNF- α -induced skin inflammation. *Eur J Immunol* 27 : 1713-1718, 1997.
 - 18) Flower RJ, Harvey EA, Kingston WP : Inflammatory effects of prostaglandin D 2 in rat and human skin. *Br J Pharm* 56 : 229-233, 1976.
 - 19) Chung JH, Youn JI : Effect of ultraviolet A on IL-1 production by ultraviolet B in cultured human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 9 : 87-93, 1995.
 - 20) Imokawa G, Yada Y, Kimura M, Morisaki N : Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is an intrinsic keratinocyte-derived growth factor for human melanocytes in UVA-induced melanosis. *Biochem J* 313 : 625-631, 1996.
 - 21) Morita A, Grewe K, Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Krutmann J : Induction of proinflammatory cytokines in human epidermoid carcinoma cells by in vitro ultraviolet A1 irradiation. *Photochem Photobiol* 65 : 530-534, 1997.
 - 22) Corsini E, Sangha N, Feldman SR : Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 13 : 147-152, 1997.
 - 23) Tebbe B, Wu S, Geilen CC, Eberle J, Kodelja V, Orfanos CE : L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 α and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 108 : 302-306, 1997.
 - 24) Kondo S, Jimbow K : Dose-dependent induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A. *J Cell Physiol* 177 : 493-498, 1998.