

EGF が皮膚炎に与える影響とメカニズム

熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座

押海 裕之

Epidermal growth factor (EGF) has been used as a component of many cosmetics. EGF has been believed to promote the turnover of the skin and has an anti-aging ability. Recently, we found that EGF regulates the expression of pro-inflammatory cytokine expression in a DDX60 RNA helicase-dependent manner. Pro-inflammatory cytokines are well known to increase vessels permeability leading to swelling, redness and pain. Our data imply that EGF can suppresses the inflammation in the skin. In this study, we further assessed the role of EGF on the inflammatory immune responses, and found that EGF suppressed delayed type hypersensitivity in mice. However, EGF did not reduce the phagocytosis ability of macrophages required for excluding waste product in the skin. Recently, severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-2 (SARS-CoV-2) causes coronavirus disease-2019 (COVID-19). SARS-CoV-2 infects host through mucosal epithelial cells, and thus it is unclear whether EGF within the cosmetics affect the immune response against SARS-CoV-2. Therefore, we investigated the effect of EGF on the antiviral activities of epithelial cells. Interestingly, EGF in the culture medium suppressed vesicular stomatitis virus (VSV)-induced cytopathic effect (CPE) on epithelial cells, although EGF attenuated the IL-6 expression from VSV-infected cells. EGF-promoted antiviral activities were also observed when cells were infected with seasonal influenza A virus. EGF attenuated the CPE of cells infected with influenza A virus, and reduced IL-6 expression levels. Interestingly, moderate reduction of SARS-CoV-2 replication was observed when EGF existed in cell culture medium. These findings elucidated novel useful aspects of EGF within the cosmetics.

1. 緒言

上皮成長因子(EGF: Epidermal Growth Factor)は、様々な化粧品に配合され、美容液、スキンケアクリーム、パック、化粧水、ファンデーションなどの成分として加えられ、加齢に伴う肌のターンオーバーの遅れの解消やコラーゲンの生成を促進するなどの効能が期待されている。一方で、EGFはその受容体であるEGFRは非小細胞肺癌を含め多くの悪性腫瘍で発現が高いため、EGFを過剰に存在することが発がんなどに与える影響についての指摘などがあり、EGFを安易に化粧品の成分として使用することの安全性については懸念もある。しかし、現状として、アンチエイジングなどを謳いEGFが配合された化粧品は現在でも数多く販売されている。

免疫と肌の透明感やハリなどは密接に関連し合うことが近年明らかとなりつつあり、特に、老廃物の除去には強い貪食能を有する皮膚のマクロファージが重要な役割を果たすことや、マクロファージなどから産生される過剰な炎症性サイトカインは局所の炎症を誘導し赤みなどの原因となることが知られている。EGFは上皮細胞の成長に影響を与えるのみならず、免疫応答などにも影響を与えることか

ら、EGFの免疫応答に与える影響を新たに明らかとすることはEGFを化粧品の成分として加えることの効果や、その安全性を考える上でも重要である。

EGFと免疫応答の関連として、特にEGFがサイトカイン受容体の下流で働くSTAT3のリン酸化がEGF受容体の活性化により促進することは古くから報告されている¹⁾。STAT3はIL-6、IL-8、IL-35などによっても活性化し、転写因子として様々な免疫応答を誘導する。一方で、EGFによる免疫制御のメカニズムについては不明な点も多く存在する。我々の研究室ではこれまで自然免疫応答の研究を続けてきており、その中でDDX60と呼ばれるヘリカーゼが炎症性サイトカインの産生に重要な役割を果たすことを発見した²⁾。興味深いことにこのDDX60について、EGFがDDX60分子のチロシンリン酸化を誘導することで炎症を抑えることを明らかとした³⁾。これはEGFがDDX60分子の機能を介して炎症を抑える役割を果たすことを示唆するが、これらが皮膚炎などの炎症に与える影響については十分に解明されていない。

一方で2020年に始まった新型コロナウイルス感染症(COVID-19: coronavirus disease-2019)のパンデミックによりウイルス感染症の問題がある。EGFは化粧水などにも配合されており、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)が感染する目や鼻や口などの粘膜にも触れる機会が多い。そのため、化粧品に配合されたEGFが免疫に影響を与えることで感染に抵抗性や感受性を与える可能性もあり、その検証も喫緊の課題となる。

本研究では「自然免疫」という視点から特にDDX60ヘリカーゼと細胞外小胞の機能に焦点をあて、EGFがこれら



Effect of EGF on hypersensitivity in the skin and its underlying mechanism

Hiroyuki Oshiumi

Department of Immunology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

の分子を介して肌のターンオーバーや健康に与える影響を解明し、EGF配合化粧品の新たな効能と機能を解明することを目的として研究を進めた。

2. 方法

2. 1. 接触性過敏反応

マウス近郊系としてC57BL/6系統の野生型マウスとDDX60遺伝子をノックアウトしたマウスを実験に使用した。動物実験にあたっては熊本大学の動物実験委員会の承認を得た実験計画書に基づいて実験を実施した。接触性過敏反応の実験系としてDNFB (dinitrofluorobenzene) の反復塗布を実施した。炎症誘導後にはEGFを添加し、炎症の増悪を組織切片の観察とサイトカイン産生を指標に評価した。

2. 2. フローサイトメトリー

マクロファージに与える影響としてTHP-1やRAW264.7細胞を用いて、CRISPR-Cas9の系を用いてDDX60のノックアウト細胞を作成した。貪食に与える影響として蛍光ラベルしたビーズの取り込みをフローサイトメトリーにより解析を行った。フローサイトメトリーではFACSキャリバーを用いて実験を実施した。

2. 3. サイトカイン量の測定

ヒト上皮細胞株であるHEK293細胞やHeLa細胞株はそれぞれ10%の牛胎児血清(FCS)を含むD-MEM (low Glc) とEagle's MEMを用いて培養した。EGFについてはそれぞれヒト組換えEGFを用い実験を実施した。炎症性サイトカインの測定においては、細胞からRNAを抽出し逆転写後に定量PCR法により定量した。また、細胞上清中のサイトカイン量についてはELISA法を用いて実施した。

2. 4. ウイルス

牛水疱性口内炎ウイルス(VSV)はVero細胞を用いて増殖させた。ウイルスの力価はVero細胞を用いたプラーク法を用いた。インフルエンザウイルスは鶏卵を用いて増殖させた。力価はMDCK細胞を用いてプラーク法により決定した。SARS-CoV-2は国立感染症研究所より分与いただいたCOVID-19患者由来のウイルス株を用いた⁴⁾。ウイルスの増殖およびプラーク法による力価測定はVeroE6/TMPRSS2細胞を用いて実施した。新型コロナウイルスのウイルス量についてはTCID50法により測定した。

3. 結果

3. 1. EGFがマクロファージ貪食能に与える影響

マクロファージ様の細胞株であるTHP-1細胞とRAW

264.7細胞に対してDDX60遺伝子をノックアウトするためにCRISPR-Cas9の実験系でそれぞれエクソン11を除去しノックアウト細胞株を作成した。DDX60遺伝子がノックアウトされたことについては定量PCR法によりmRNAの発現量で確認した。

野生型とDDX60ノックアウト細胞株に対して、その培養液にEGFを添加し、それぞれの貪食能を蛍光ラベルしたビーズの取り込み量でFACSにより評価した。その結果、EGF添加により濃度依存的に野生型のマクロファージ細胞株の貪食能の増加が観察された。一方で、DDX60をノックアウトしてもマクロファージの貪食能は低下しなかった。これらのことはEGFが制御するDDX60の機能はマクロファージの貪食能には関与しないことが示唆された。

3. 2. EGFが過剰な炎症を抑制するメカニズム

DDX60分子は通常ウイルス由来のRNAを認識して活性化するが正常の細胞株にはウイルスは存在しない。しかしDDX60の欠損細胞では定常時での炎症性サイトカインの産生も減少することが明らかとなったため、DDX60の内在性のリガンドを探索した。細胞質内のウイルス認識受容体であるRIG-IとMDA5は通常は内在性のLINE-1やAluなどのレトロエレメントを認識しないが、RIG-IやMDA5のアミノ酸変異によりこれらのレトロエレメントを認識することが知られている。MDA5のG495R変異はAGSの患者で発見されヒトのAlu配列を過って認識できるようになることが知られている。我々はこのMDA5-G495R変異を野生型とDDX60のKO細胞に発現させI型インターフェロンとIL-6などの炎症性サイトカインの産生量を比較したところ、MDA5-G495R変異によるIL-6の産生はDDX60のノックアウトにより減弱することを発見した。これらは、内在性のレトロエレメントがDDX60を介して炎症性サイトカインを誘導すること、また、EGFがこれを抑制することで過剰な炎症を制御できることを示唆する。

3. 3. EGFが過敏反応に与える影響 (マウス動物モデル)

マウスの接触型過敏反応の動物モデル実験において野生型とDDX60ノックアウトマウスで比較した。DNFBをマウスの耳に反復塗布し、接触過敏反応による腫れの程度を測定したところ、DDX60ノックアウトマウスでは腫れが野生型マウスと比較し緩和されることが示唆された。一方で、この過敏反応に関与する因子としてリンパ節や脾臓のT細胞数などを測定したが、野生型とDDX60ノックアウトマウスでは有意な差が見られず、そのメカニズムの解明については今後の課題である。

3. 4. EGFによる抗ウイルス作用

DDX60分子はウイルス感染時のサイトカイン産生に関与しており、EGFがDDX60依存的なサイトカイン産生を抑制することから、ウイルス感染時の免疫応答におけるEGFの役割について検討した。

VSVは実験室で古くから用いられているウイルスでありヒト上皮細胞を含め様々な細胞に感染する。我々はEGF存在下で培養したHeLa細胞へVSVを感染させ、36時間後に細胞をホルマリンで固定した後にクリスタルバイオレットで染色し生細胞を観察することでVSVの細胞傷害活性(CPE: Cytopathic effect)について調べた。実験の結果、ウイルスによる細胞傷害活性がEGFによって濃度依存的に抑制されることが明らかとなった(図1)。一方で、EGFはVSV感染時のI型インターフェロン産生を増加させ

たのに対し、逆にIL-6の産生を抑制することが示された(図2)。これはEGFがサイトカイン産生を抑え炎症を抑制しながらもVSVに対して抗ウイルス作用を示すことを示唆する。

次に季節性インフルエンザウイルスに対する影響について調べた。EGFを培養上清に加えることで、ウイルスの増殖については抑制する傾向が観察された(図3)。一方でウイルス感染後のサイトカイン産生に与える影響について調べたところ、I型インターフェロン産生がEGFにより増加したのに対しIL-6を含む炎症性サイトカイン産生は逆に低下することが明らかとなった(図3)。

2020年にCOVID-19パンデミックの原因となったSARS-CoV-2に対する影響について次に調べた。国立感染症研究所より分与された、COVID-19患者より単離さ

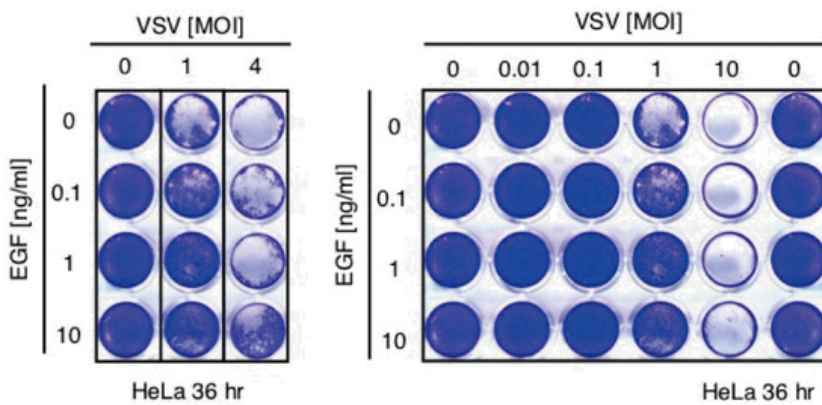


図1 VSVによる細胞傷害活性におけるEGFの効果

HeLa細胞を図に示す濃度のEGFを含む培養液で培養し、VSVをMOI=0, 1, 4で感染させた。感染後36時間の時点で細胞をホルマリンで固定したのちにクリスタルバイオレットを用いて生細胞を染色した。EGFの転化により細胞傷害が抑制されることが示唆された。

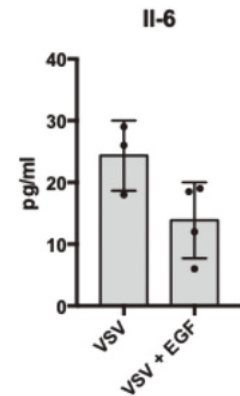


図2 VSVによるIL-6産生誘導におけるEGFの役割

HeLa細胞をVSVでMOI=1の条件で感染させ、感染後24時間の時点での細胞上清中のIL-6のタンパク量についてELISAにより測定した。培養液中のEGFによりIL-6の産生量が減少した。

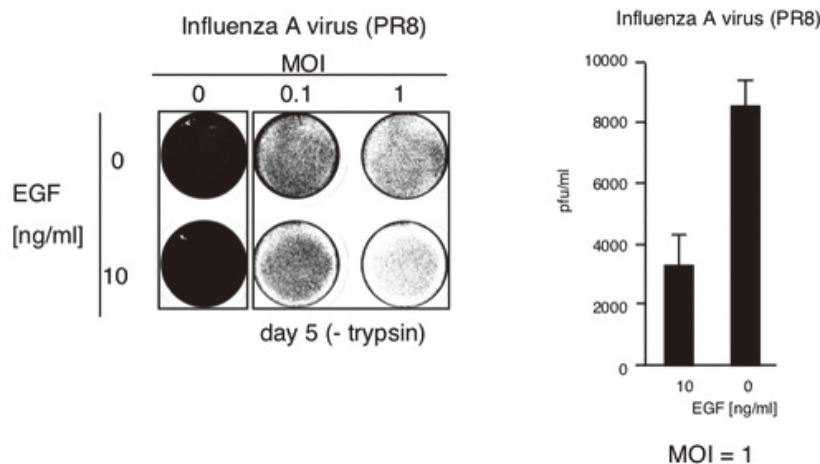


図3 インフルエンザウイルス感染に対するEGFの効果

細胞培養液に10ng/mLのEGFを添加することでインフルエンザウイルスによる細胞傷害が抑制されることが示唆された(図左)。一方で、このときの培養上清中のウイルス量を比較するとEGF存在下ではウイルス量が低下していた。

れたSARS-CoV-2株について、EGFの有無によるウイルス量の違いについてACE2を過剰発現させたHEK293細胞を用いて調べた。SARS-CoV-2感染2日後の細胞上清のウイルス量についてTCID50法により測定したところEGF存在下ではウイルス量がやや減少する傾向が観察された。

4. 考 察

EGFは上皮の成長を促し肌のターンオーバーなどを促進することから一時期は多くの化粧品に配合され使用されており、アンチエイジングを謳う数多くの商品にも配合されていた経緯がある。一方で、悪性腫瘍でEGFの受容体が過剰発現するなど健康への影響についても懸念が指摘されることがある。

EGFと免疫との関連についてはこれまで十分に解明されてこなかった。創傷治癒の過程で初期の傷口では外来からの病原体などの異物が免疫応答により排除される。その際には高い貪食能を示す好中球に加えてマクロファージなどの細胞も重要な役割を果たす。その過程ではオプソニン化された異物の貪食に加えて、炎症を誘導するIL-1 β 、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインが産生される。一方で異物が除去され上皮細胞の増殖とともに創傷治癒が完了する段階ではEGFが重要な働きをする。このEGFが上皮の成長を促す以前の免疫応答にどのような影響を与えるのかについては十分な役割が解明されてこなかった。このような状況の中で我々は以前にEGFがDDX60分子のリン酸化を誘導し、それにより炎症性サイトカインの産生が抑制され、炎症の抑制につながることを発見した。

本研究ではEGFのDDX60分子を介した免疫制御機構について調べたところ、1) EGFはマクロファージの貪食を促すが、DDX60分子は関与しないこと、2) EGFは内在性レトロエレメントによるDDX60依存的な炎症性サイトカイン産生を抑制すること、3) EGFは過敏反応の抑制に弱いながら寄与すること、などが明らかとなった。DDX60が制御するTNF- α やIL-6などの炎症性サイトカインは毛細血管の内皮細胞の透過性を亢進し、炎症を誘導することが知られている。これらのことから、EGFはマクロファージの貪食能の亢進による老廃物の除去を促し上皮の成長を促進する効果があることに加え、赤み、かゆみ、腫れなどの原因となる炎症を抑制する働きがあることが示唆された。

2020年に入りSARS-CoV-2によるCOVID-19のパンデミックが世界的な問題となっている。SARS-CoV-2は粘膜上皮細胞に感染すると考えられており、上気道と下気道より感染する。一方で、他の粘膜上皮から感染するウイルスと同様に目などの粘膜からも感染すると考えられている。そのため、化粧水やパックなどにEGFが含まれてい

た場合には、これらが目などの上皮細胞に触れ、免疫応答に影響を与える可能性が考えられた。本研究ではEGFが上皮細胞の抗ウイルス作用に与える影響についても調べた。EGFはDDX60の機能を抑制しサイトカイン産生を抑制することから、DDX60依存的な抗ウイルス作用を抑制することが懸念されたが、実験の結果は反対にEGFが上皮細胞の抗ウイルス作用を強めることを発見した。ウイルス実験で古くから用いられているVSVに対してはEGFが上皮細胞のウイルスによる細胞傷害活性を抑制することが示され、季節性インフルエンザについてはその増殖を抑制することが示唆された。一方でCOVID-19のパンデミックとなるSARS-CoV-2に対する影響では、ウイルスの増殖をやや抑制する傾向が見られた。これらの結果、EGFはDDX60依存的なサイトカイン産生を抑制するものの上皮細胞の抗ウイルス活性は抑制せず、むしろ活性化することが示唆された。これらはEGFを配合する化粧品などが新型コロナウイルス感染に対しては特に悪影響がないことを示唆する。

5. 総 括

EGFの効果については肌のターンオーバーを促進しアンチエイジング効果があると謳われる一方で、悪性腫瘍の増殖促進など負の側面があることも懸念されている。本研究ではEGFの効果として肌に影響を与える炎症を抑制する効果があることを示した。さらに、近年問題となっている新型コロナウイルス感染に対する免疫応答にも悪影響を示さないことが示唆された。これらは化粧品にEGFを配合することの効果や効能についての根拠を提示するものであり、化粧品の安全性や機能についての理解と安心につながると期待される。

(引用文献)

- 1) Zhong, Z., Wen, Z. & Darnell, J.E., Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* **264**, 95-98 (1994).
- 2) Miyashita, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M. & Seya, T. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol Cell Biol* **31**, 3802-3819 (2011).
- 3) Oshiumi, H. et al. DDX60 Is Involved in RIG-I-Dependent and Independent Antiviral Responses, and Its Function Is Attenuated by Virus-Induced EGFR Activation. *Cell Rep* **11**, 1193-1207 (2015).
- 4) Matsuyama, S. et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 7001-7003 (2020).