

## 主論文

High calcium enhances the expression of double-stranded RNA sensors and antiviral activity in epidermal keratinocytes

(高濃度カルシウム環境下でケラチノサイトの二本鎖 RNA 受容体の発現と抗ウイルス活性は増強する)

### [緒言]

表皮ケラチノサイトは常に外界と接しており、侵入を試みる病原体に対して最初の防御となる。表皮ケラチノサイトにおいては二本鎖 RNA の受容体として Toll-like receptors (TLR3), MDA5, RIG-I (が発現しており、自然免疫や獲得免疫の免疫応答を促進することで免疫応答において重要な役割を果たしている。細胞外カルシウム濃度の上昇がケラチノサイトの分化に寄与していることは広く知られているが、二本鎖 RNA 受容体の発現および機能への影響はよく知られていない。我々は高濃度細胞外カルシウム濃度下で表皮ケラチノサイトにおいて dsRNA 受容体発現と抗ウイルス活性にどのような変化を生じるか調べた。

### [材料と方法]

#### 細胞培養・分化と刺激

培養液 (カルシウム濃度 0.06mM) で培養、増殖した正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEKs) を高濃度カルシウム培養液 (0.5-2mM) 下で 24-96 時間培養して細胞分化を促し、合成 dsRNA である poly (I:C) 0.1-10  $\mu$  g/ml で 24-96 時間刺激した後に培養液と細胞をそれぞれ回収した。細胞は TRIzol Reagent で処理して RNA を抽出した。

#### リアルタイム定量 (qPCR)

RNA から iScript cDNA Synthesis Kit で cDNA を生成、TaqMan Gene Expression Assays を使って細胞の *INFB1* (assay ID: Hs01077958\_s1), *TLR1* (assay ID: Hs00413978\_m1), *TLR2* (assay ID: Hs00610101\_m1), *TLR3* (assay ID: Hs00152933\_m1), *IFIH1* (MDA5) (assay ID: Hs01070332\_m1), *DDX58* (RIG-I) (assay ID: Hs00204833\_m1), *KRT10* (assay ID: Hs00166289\_m1), *DEFB4* (assay ID: Hs00823638\_m1), *MARCO* (assay ID: Hs00198937\_m1), *IFNA2* (assay ID: Hs00265051\_s1), *DEFB103* (assay ID: Hs00218678\_m1), *IL6* (assay ID: Hs00174131\_m1) の発現量を定量している。*GAPDH* mRNA を内在性コントロール群とし、各検体の mRNA 発現量は *GAPDH* mRNA との比較発現量として算出した。

#### 免疫蛍光抗体染色

チャンバースライド上で培養した NHEKs を高濃度 Ca (2mM) 培養液下あるいは通常の培養液下で 24 時間刺激した後に固定、ウサギ抗 TLR3 抗体を投与した上で FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を使って蛍光標識し、ケラチノサイト内の TLR3 の局在を評価した。

#### ELISA

培養液中の IFN- $\beta$  発現量は VeriKine Human IFN- $\beta$  ELISA Kit を使って測定した。また、ヒト  $\beta$  ディフェンシン 2 (HBD2) 発現量はマウスモノクローナル HBD2 抗体を固相化し、培養上清および rHBD2 を反応させた後に、HRP 標識 HBD2 二次抗体を用いて酵素反応を光量計により測定し、酵素抗体法で定量した。

#### ウイルスplaques assay

NHEKs を poly (I:C) で 24 時間刺激した後、1 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1, KOS 株) に 1 時間暴露することで感染させた。その後培養液を  $\gamma$  グロブリンを含む培養液に置換し、48 時間後培養した後に形成したウイルスplaques数をクリスタルバイオレット染色で可視化した。

## [結果]

### 高濃度カルシウムによって NHEKs における dsRNA 受容体の発現が亢進する

高濃度カルシウム培養液下の NHEKs において *TLR3*, *IFIH1* (MDA5), *DDX58* (RIG-I) といった二本鎖 RNA 受容体の mRNA 発現は著明に亢進していた。また、分化マーカーであるケラチン 10 をエンコードする *KRT10* や *TLR1*, *TLR2* といった他の mRNA 発現も同様に亢進していた。コラーゲン様構造マクロファージ受容体 (macrophage receptor with collagenous structure: MARCO) は HSV-1 の侵入受容体と考えられているが、同様に発現の亢進を認めた。また、ケラチノサイトにおいて *TLR3* 発現を誘導するとされる *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *IL-29* については *IFNA2* (*IFN- $\alpha$* ) の発現は亢進を認めたものの、*IFN- $\gamma$* , *IL-29* の発現は認められなかった。

高濃度カルシウム培養液下の NHEKs の変化を経時的に調べたが、時間経過とともに *TLR3*, *IFIH1* (MDA5), *DDX58* (RIG-I) いずれの発現量も *KRT10* と同様に上昇していた。

### ケラチノサイトにおける細胞内 TLR3 の発現は高濃度カルシウムによって誘導される

NHEKs において TLR3 タンパクの発現パターンを調べるため免疫蛍光抗体染色を行ったところ、カルシウム刺激に伴って NHEKs の細胞質において TLR3 発現が増加していた。ケラチノサイトにおいて TLR3 mRNA, タンパク両者の発現が高濃度カルシウムの培養下で亢進すると考えられた。

### 高濃度カルシウムによってケラチノサイトの抗ウイルス活性が亢進する

高濃度カルシウム培養下で NHEKs の poly (I:C) を介した抗 HSV-1 活性は著明に亢進していた。抗ウイルス物質の発現を調べたところ、抗ウイルス活性を有することが報告されている抗菌ペプチド HBD2 やヒト  $\beta$  ディフェンシン 3 (DEFB103) の産生は poly (I:C) を介して産生の亢進を認められるが、高濃度カルシウム培養によってその発現はさらに亢進が認められた。しかし、I 型インターフェロンの *IFN- $\beta$*  については抗ウイルス活性において主要な役割を果たすと考えられたが、予想に反して亢進が認められなかった。

## [考察]

我々はカルシウム高濃度環境下のケラチノサイトにおいて濃度依存性、時間依存性に *TLR3* の発現が誘導されることを報告した。*TLR3* はエンドソームに局在する二本鎖 RNA 受容体でケラチノサイトにおいて細胞外の poly (I:C) を認識できるのに対し、MDA5 や RIG-I は細胞質に局在しており、細胞内に導入されて初めて poly (I:C) を認識するとされる。これらの受容体はウイルス感染に対する皮膚の免疫応答で重要な役割を果たしていると考えられるが、今回の実験では poly (I:C) は細胞内に導入されたものではなく、単純に培養液に加えられているだけであることから *TLR3* が最も重要な二本鎖 RNA 受容体として機能していると考えられた。さらに NHEKs において高濃度カルシウム培養下で *IFN- $\alpha$*  も同様に誘導されていたことから *IFN- $\alpha$*  はケラチノサイトの *TLR3* 発現亢進に関与している可能性が考えられた。

また、我々は HSV-1 に対する抗ウイルス効果も同様にカルシウム高濃度環境下で亢進することを報告した。ケラチノサイトの抗ウイルス活性については *IFN- $\beta$*  が主要な役割を果たしていると考えられているが、我々の研究では高濃度の細胞外カルシウム下で poly (I:C) を介した NHEKs の *IFN- $\beta$*  発現は低下していた。しかし反対に抗菌ペプチドである HBD2, HBD3 の発現は亢進していた。HBD2, HBD3 は抗ウイルス効果も有していることが報告されていることからウイルスplaque定量の結果は *IFN- $\beta$*  よりもこれらの分子に因ると考えられた。

我々の研究では高濃度カルシウム環境下で二本鎖 RNA 受容体に加えて MARCO の発現が亢進していた。MARCO は発現亢進することで HSV の侵入が容易になると予想されることから、今回の抗ウイルス活性の増強は MARCO の影響ではないと考えられた。よって、高濃度の細胞外カルシウムあるいはそれによって誘導されるケラチノサイトの分化が *TLR3* 発現を亢進させ、それによって抗ウイルス活性が亢進されると考えられた。

また、我々は NHEKs において高濃度カルシウム環境下で *TLR1* や *TLR2* の発現が亢進することを報告した。高濃度カルシウムによってセリンプロテアーゼ活性や *TLR1*, *TLR2* を介した細菌リポペプチドの感受性が増強されると考えられる。

### [結論]

我々の研究結果からは細胞外の高カルシウム濃度によって表皮ケラチノサイトにおいて二本鎖RNA受容体の発現亢進や抗ウイルス活性の賦活が引き起こされることが示唆されると考えられる。正常の表皮ではカルシウムの濃度勾配は顆粒層で最も高いとされており、我々の研究結果からTLR3の発現は基底層と比較して顆粒層を含む上層においてより亢進しており、病原ウイルスに対する防御反応においてより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。