

原著

ヒト培養ケラチノサイトで Tumor Necrosis Factor- α と Interferon- γ は相乗的に Retinoic Acid-Inducible Gene-I の発現を増加させる

皆川 智子¹⁾ 木村 一之¹⁾ 松崎 康司¹⁾ 中野 創¹⁾
今泉 忠淳²⁾ 佐藤 敬²⁾ 澤村 大輔¹⁾

抄録 【背景】 Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) は RNA ヘリカーゼの一種であり、ウイルス感染により、細胞質内に蓄積する二重鎖 RNA を認識する細胞内受容体である。【目的】 Tumor necrosis factor- α (TNF- α) と Interferon- γ (IFN- γ) はそれぞれ表皮ケラチノサイトにおける RIG-I の発現を増強させるが、その作用機序は不明である。本研究では、培養表皮ケラチノサイトである HaCaT 細胞において、RIG-I の発現に対する TNF- α と IFN- γ の協調作用を検討した。【結果】 RIG-I の mRNA とタンパク発現量を半定量的 RT-PCR 法とウエスタンブロッティング法でそれぞれ解析した。その結果、TNF- α と IFN- γ を同時添加した条件では、RIG-I タンパクと mRNA 発現量が相乗的に増加していた。【結論】 両サイトカインが相乗的に RIG-I の発現を上昇させたことから、2つのサイトカインは別々のシグナル伝達経路を介して RIG-I の発現を制御していると考えられた。

弘前医学 59: 83—89, 2008

キーワード: ヒト培養ケラチノサイト; HaCaT 細胞; Tumor necrosis factor- α ; Interferon- γ ; Retinoic acid-inducible gene-I.

ORIGINAL ARTICLE

TUMOR NECROSIS FACTOR- α AND INTERFERON- γ SYNERGISTICALLY INDUCE EXPRESSION OF RETINOIC ACID-INDUCIBLE GENE-I IN CULTURED HUMAN KERATINOCYTES

Satoko Minakawa¹⁾, Kazuyuki Kimura¹⁾, Yasusi Matsuzaki¹⁾, Hajime Nakano¹⁾,
Tadaatsu Imaizumi²⁾, Kei Satoh²⁾, and Daisuke Swamura¹⁾

Abstract [Introduction] Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is a putative RNA helicase. Upon viral infection, RIG-I protein binds to the viral double-stranded RNA. [Objectives] Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) stimulate the expression of RIG-I mRNA and protein in epidermal keratinocytes, and that mechanisms have not been well elucidated. The purpose of this study was to investigate the cooperative effect of TNF- α and IFN- γ to the expression of RIG-I. [Results] The steady-state levels of RIG-I mRNA and protein amounts were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting, respectively. RIG-I mRNA and protein levels were synergistically increased through the administration of both the TNF- α and IFN- γ in HaCaT keratinocytes. [Conclusion] These findings imply that the induction of RIG-I expression by TNF- α and IFN- γ is utilized by the different signaling pathway from each other.

Hirosaki Med. J. 59: 83—89, 2008

Key words: Epidermal keratinocytes; HaCaT cell; Tumor necrosis factor- α ; Interferon- γ ; Retinoic acid-inducible gene-I.

Departments of ¹⁾ Dermatology and ²⁾ Vascular Biology, Institute of Brain Science, Hirosaki University Graduate School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki, Aomori 036-8562, Japan
Correspondence: S. Minakawa

Received for publication, December 13, 2007

Accepted for publication, December 21, 2007

弘前大学大学院医学研究科¹⁾皮膚科学講座,²⁾附属脳神経血管病態研究施設脳血管病態学講座

別刷請求先: 皆川智子

平成19年12月13日受付

平成19年12月21日受理

はじめに

自然免疫は、生体内のウイルス感染初期にみられる防御機構として重要な役割をもつ。ウイルスは細胞に感染するとそのゲノムを細胞質内に注入し、細胞の機能を利用してウイルスの複製を行う。これまでウイルスの複製の結果、細胞質内に蓄積する細胞内二重鎖 RNA (dsRNA) を細胞が認識していることは分かっていたが、そのメカニズムは不明であった。近年、膜貫通型細胞外受容体である Toll-like receptor (TLR) を介さずに、細胞内でウイルス由来の dsRNA を認識し、インターフェロン (IFN) 遺伝子の発現を導く分子として retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) が同定された¹⁾。

RIG-I は培養前骨髄球性白血病細胞においてレチノイン酸により誘導される遺伝子として同定され、RNA ウイルス感染に対する反応には不可欠な分子と考えられている²⁾。この RIG-I は DExH-box ファミリーに属する RNA ヘリカーゼの一種であると推測され³⁾、ウイルスが細胞に感染すると、RIG-I が C 末端側のヘリカーゼドメインで細胞内二重鎖 RNA を検知し、N 末端にある caspase recruitment domains (CARDs) を介して I 型 IFN 遺伝子発現誘導シグナルが伝達される^{1,4)}。

抗原提示細胞が末梢リンパ組織で未感作ヘルパー T 細胞を活性化すると、T 細胞は T-helper-1 (Th1) か Th2 のいずれかのエフェクターヘルパー T 細胞に分化する。このうち Th1 細胞はインターフェロン- γ (IFN- γ) や腫瘍壊死因子- α (TNF- α) を分泌する。

IFN- γ は増殖抑制作用や炎症誘発作用のほか、免疫調節作用も有する。IFN- γ が IFN- γ receptor α/β に結合すると、Janus protein tyrosine kinase (JAK) 1/2 や Signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1) の活性化などがおこり、細胞に様々な反応が誘発される⁵⁾。

また、マクロファージの細胞質では、阻害性タンパク I κ B が二量体に強く結合して NF- κ B を不活性型にしているが、TNF- α が細胞表面受容体に結合すると、不活性型として隔離されている

NF- κ B が活性化され、種々の免疫反応が起こる。

これまでの研究で、培養血管内皮細胞や血管平滑筋細胞において、IFN- γ は RIG-I 発現を増加させることが示された⁶⁾。また、ヒト表皮ケラチノサイトの不死化細胞である HaCaT 細胞⁷⁾ において、TNF- α と IFN- γ が RIG-I タンパクや RIG-I mRNA の発現を増加させることや、RIG-I タンパクは細胞質に局在することが明らかになった⁸⁾。そこで、今回我々は、HaCaT 細胞において RIG-I 発現に対する TNF- α と IFN- γ の相互作用を検討した。

材料と方法

1. 細胞培養

HaCaT 細胞は、抗生剤および 10% ウシ胎児血清を加えた minimal essential medium (MEM, GIBCO, Auckland, N.Z.) を培地として、60 mm プラスチック組織培養ディッシュで培養した。培地は 1 日おきに交換し、サイトカイン添加 12 時間前にリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄したのち、0.5% ウシ胎児血清加 MEM に交換した。IFN- γ として recombinant human (r(h)) IFN- γ (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), TNF- α として r(h) TNF- α (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用した。TNF- α 添加後、RIG-I mRNA の発現は 6 時間で、RIG-I タンパクは 24 時間でピークに達することから⁸⁾、RIG-I mRNA の分析には TNF- α や IFN- γ 添加 6 時間後の細胞を使用し、RIG-I タンパクの分析には TNF- α や IFN- γ 添加 24 時間後の細胞を使用した。

2. ウェスタンブロッティング

サイトカイン添加 24 時間後、HaCaT 細胞を RIPA lysis buffer (1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.57 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich), 10 μ g/ml aprotinin (Sigma-Aldrich), 10 μ g/ml leupeptin (Sigma-Aldrich), 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich)) を用いて氷上で溶解した。溶解液を 15000 rpm で 30 分間遠心したのち、上清分画を -80°C で保存した。溶解液のタンパク濃度は Protein Assay KitTM (Bio-Lad) で測定

した。同量のタンパク (20 μ g) を 10% (w/v) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis で分離し, Hybond™ ECL™ nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) に転写した。この転写した膜を用いて室温で 1 時間振盪してブロッキングした。その後, 一次抗体 (rabbit anti-RIG-I antiserum, 1:10,000 dilution) に交換し, 室温で 1 時間振盪した後, 4°C で約 12 時間保存した。その後, 二次抗体 (ECL anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked species-specific whole antibody from donkey, 1:2,000 dilution; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) で室温下 1 時間振盪後, ECL enhanced chemiluminescence detection reagent ECL (Amersham, UK) を用いて, RIG-I タンパクを検出した。

ウエスタンブロッティングの結果は NIH Image analysis software を用いて定量解析した。またコントロールとして β -actin の発現を測定した。

3. RNA 抽出と reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

サイトカイン添加 6 時間後, HaCaT 細胞を RNeasy™ Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) の Buffer RLT を用いて氷上で溶解した。溶解液から total RNA を RNeasy total RNA isolation kit (Quiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。0.5 μ g の total RNA から, oligo (dT) 20 プライマーを用いて cDNA を合成し, 次に PCR を行った。RIG-I と human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の cDNA を合成するためのプライマーは以下のものを使用した:

RIG-I-F (5'-GCA TAT TGA CTG GAC GTG GCA-3')

RIG-I-R (5'-CAG TCA TGG CTG CAG TTC TGT C-3')

GAPDH-F (5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'),

GAPDH-R (5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3').

RIG-I cDNA 合成の反応条件は (98°C, 1 min) を

1 サイクル, (98°C, 10 sec; 58°C, 2 sec; 74°C, 30 sec) を 22 サイクル, (4°C, 1 min) を 1 サイクルとした。GAPDH 合成反応条件は (98°C, 1 min) を 1 サイクル, (98°C, 10 sec; 60°C, 2 sec; 74°C, 30 sec) を 20 サイクル, (4°C, 1 min) を 1 サイクルとした。

生成した cDNA を ethidium bromide 含有 2.0% agarose gel で電気泳動した。RIG-I と GAPDH の PCR 産物はそれぞれ 644 bp と 598 bp となった。等量の RNA から作製した RIG-I と GAPDH の cDNA のバンドは NIH Image analysis software で解析した。

結 果

TNF- α あるいは IFN- γ を単独に添加した場合の RIG-I タンパクの発現について

TNF- α あるいは IFN- γ を単独に添加して RIG-I タンパクの発現を検討した。濃度は, TNF- α 投与群では 0-10-20-40-80-160 ng/ml とし, IFN- γ 投与群では 0-2.5-5-10-20-40 ng/ml とした。その結果, *de novo* での RIG-I タンパク合成量は非刺激時には殆ど発現せず, TNF- α が 20 ng/ml までは濃度依存性に増加し 20 ng/ml で平衡に達した。また, IFN- γ は 10 ng/ml までは濃度依存性に増加し, 10 ng/ml からは平衡に達した (図 1)。

TNF- α あるいは IFN- γ を単独に添加した場合の RIG-I mRNA の発現について

TNF- α あるいは IFN- γ を単独に添加して RIG-I mRNA の発現を検討した。濃度は, TNF- α 投与群では 0-20-40-80 ng/ml とし, IFN- γ 投与群では 0-10-20-40 ng/ml とした。その結果, *de novo* での RIG-I mRNA 合成量は非刺激時には殆ど発現せず, TNF- α が 20 ng/ml, IFN- γ は 10 ng/ml で平衡に達した (図 2)。

TNF- α および IFN- γ を同時に添加した場合の RIG-I タンパクの発現について

TNF- α および IFN- γ を同時添加して, RIG-I タンパクの発現を検討した。濃度は, TNF- α / IFN- γ をそれぞれ, 0/ 0- 20/ 0- 0/ 10- 20/ 10 ng/ml で投与した場合と, 倍量の, 0/ 0- 40/ 0-

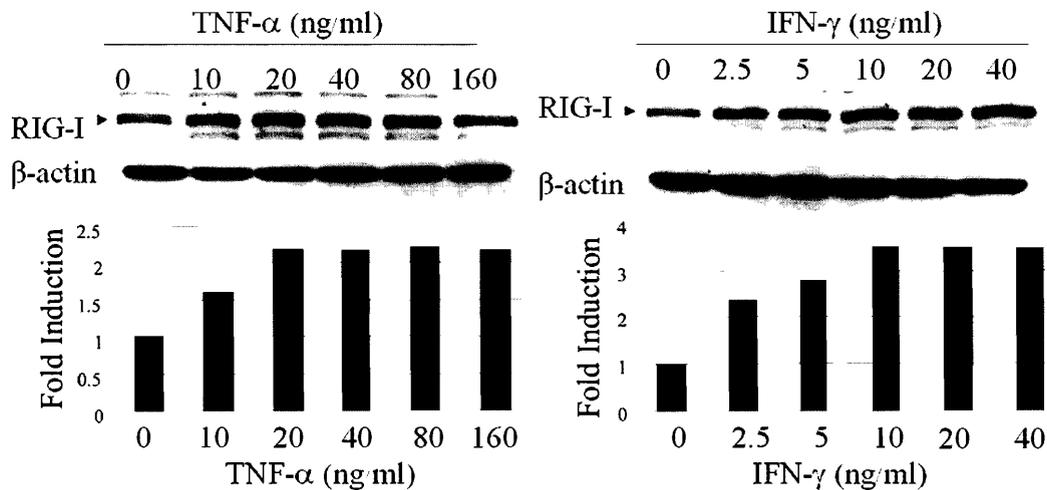


図1. TNF- α あるいはIFN- γ を単独に添加した場合のRIG-Iタンパクの発現。
HaCaT細胞にTNF- α 添加24時間後のRIG-Iタンパク発現はTNF- α が20 ng/ml
ではほぼ平衡に達した。同様に、IFN- γ は10 ng/mlのときに、ほぼ平衡に達した。

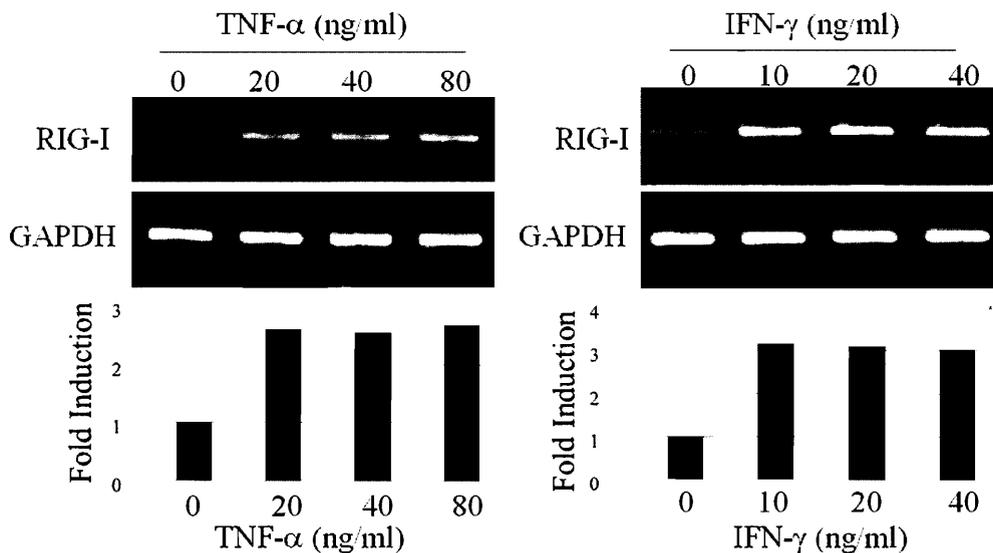


図2. TNF- α あるいはIFN- γ を単独に添加した場合のRIG-I mRNAの発現。
HaCaT細胞にTNF- α 添加6時間後のRIG-I mRNA発現はTNF- α が20 ng/mlで
ほぼ平衡に達した。同様に、IFN- γ は10 ng/mlのときに、ほぼ平衡に達した。

0/20-40/20 ng/mlで投与した場合について測定した。その結果、TNF- α とIFN- γ をそれぞれ単独に添加した場合に比して、同時に添加したことで、RIG-Iタンパクの発現が相乗的に増加した(図3)。

TNF- α およびIFN- γ を同時に添加した場合のRIG-I mRNAの発現について

TNF- α およびIFN- γ を同時に添加して、RIG-I mRNAの発現を検討した。濃度は、同様にTNF- α /IFN- γ をそれぞれ、0/0-20/0-0/10-20/10 ng/mlで投与した場合と、倍量の、0/

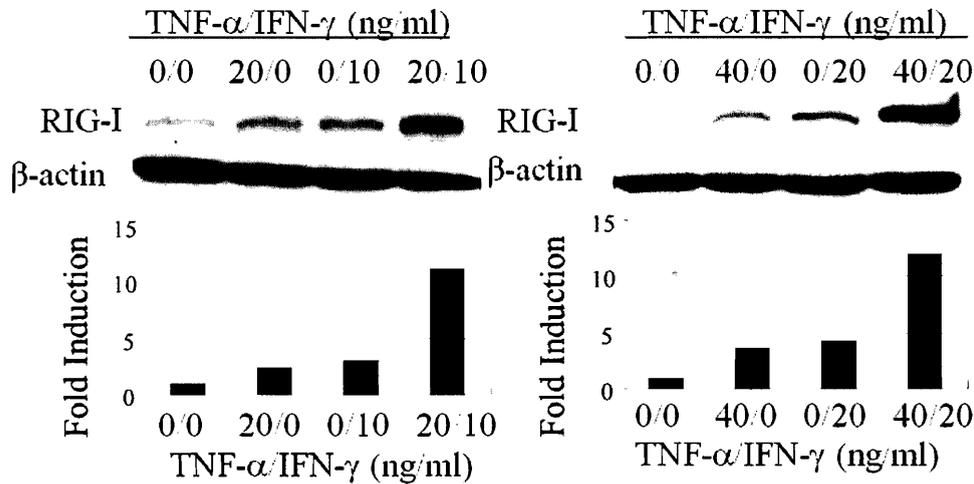


図3. TNF- α および IFN- γ を同時に添加した場合の RIG-I タンパクの発現について. HaCaT 細胞に TNF- α 20 ng/ml と IFN- γ 10 ng/ml を同時に添加した 24 時間後の RIG-I タンパク発現はそれぞれ単独より相乗的に増加した.

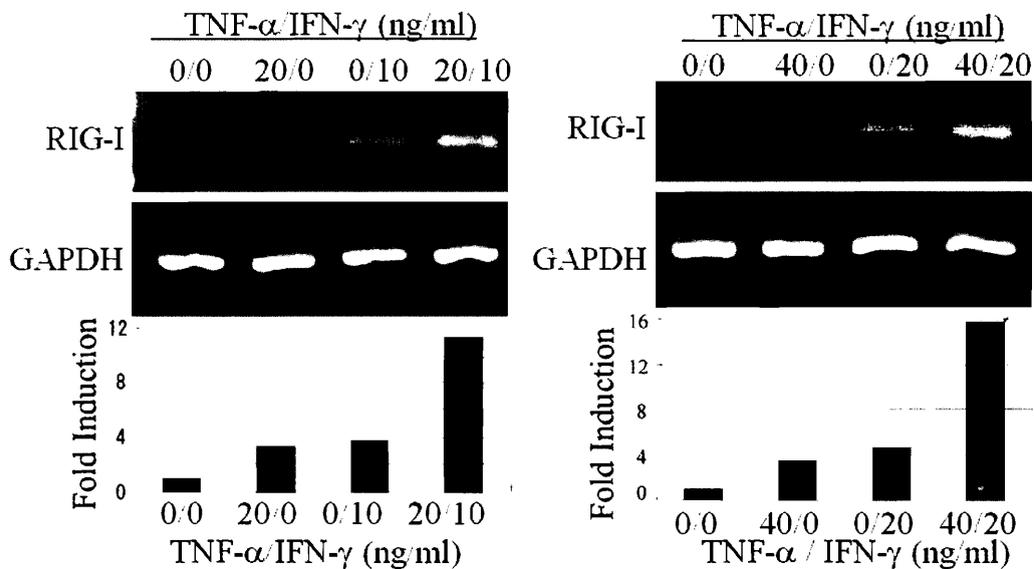


図4. TNF- α および IFN- γ を同時に添加した場合の RIG-I mRNA の発現. HaCaT 細胞に TNF- α 20 ng/ml と IFN- γ 10 ng/ml を同時に添加した 6 時間後の RIG-I mRNA 発現はそれぞれ単独より相乗的に増加した.

0- 40/ 0- 0/ 20- 40/ 20 ng/ml で投与した場合について測定した. TNF- α と IFN- γ をそれぞれ単独に添加した場合に比して, 同時に添加したことで RIG-I mRNA の発現は相乗的に増加した (図 4).

考 察

生体最外層に位置する表皮の大部分はケラチノサイトからなる. ケラチノサイトは定常状態ではごくわずかの種類のサイトカインを微量に産生するのみだが, ウイルスに感染すると活性化され,

多くのサイトカインを分泌するようになる。

現在, 抗サイトカイン療法はサイトカインが病態形成に関係する疾患への新しい治療手段として期待されている。過剰に産生されたサイトカインが様々な自己免疫疾患を引き起こすと考えられており, 原因となるサイトカインを中和する治療法の開発が試みられている。Skurkovichらは自己免疫疾患の治療にTNF- α を除去することを提案したほか, 抗IFN- γ をリウマチ性関節炎, 移植拒絶反応, 円形脱毛症, 乾癬性関節炎などの治療に用いて, 改善したと報告している⁹⁾。また, 特に皮膚科学分野では, TNF- α をターゲットにしたインフリキシマブが, 炎症性角化症である乾癬の治療薬として期待されている。

乾癬の病変部の表皮には, ケラチン K6 (過増殖型ケラチン) が現れるが, IFN- γ や TNF- α がケラチン K6 をタンパクレベル, mRNA レベル, プロモーターレベルで誘導することが報告された¹⁰⁾。また, IFN- γ は正常表皮細胞の増殖を抑制し, アポトーシスを誘導するが, 乾癬の表皮ではアポトーシスの誘導が認められないという報告¹¹⁾ や, 乾癬の表皮細胞では IFN- γ に対する STAT-1 の応答が減弱しているとの報告もある¹²⁾。このように TNF- α と IFN- γ はケラチノサイトの異常により生ずる乾癬の病態に関与することから, これらのサイトカインはケラチノサイトの機能に密接に関与することが推測されている。

RIG-I 発現調節のメカニズムを調べることは乾癬等の病態解明のために非常に有用と考えられるが, 表皮ケラチノサイトにおける TNF- α と IFN- γ による RIG-I 発現の検討は Kitamura ら⁸⁾ の報告例のみである。我々は, ヒト表皮ケラチノサイトにおける炎症性サイトカインによる RIG-I 発現調節のメカニズムをさらに調べるため, TNF- α と IFN- γ による RIG-I 発現を検討した。本研究の注目すべき点は, TNF- α と IFN- γ を同時に添加することによる RIG-I 発現の相乗効果を検討したことである。近年, 培養腸上皮細胞に TNF- α と IFN- γ を同時に添加すると, それぞれ単独添加に比べ, インターロイキン (IL)-32 α や CXCL10 遺伝子が mRNA レベルとタンパクレベルで相乗的に増加したことが報告されている^{13, 14)}。

本研究では, HaCaT 細胞において, 非刺激時には RIG-I タンパクと mRNA が殆ど発現しないのに対し, TNF- α や IFN- γ を添加した場合, RIG-I タンパクと mRNA が濃度依存性に増加することを示した。しかも, TNF- α と IFN- γ を同時に添加すると, それぞれ単独添加に比べ, RIG-I タンパクと mRNA 発現が相乗的に増加することを示した。この現象から, TNF- α と IFN- γ はそれぞれ異なるシグナル伝達経路によって RIG-I 発現を制御していると推測される。今後, プロモーター解析などにより, 更なる詳細な解析が期待される。

細胞はウイルス感染を複数の方法で検知して自然免疫を誘導する。今後, IFN 遺伝子活性化メカニズムの解析が進展し, ウイルスに対する細胞の反応が分子レベルで明らかになることにより, ウイルス感染に対する新たな治療法をもたらすことが期待される。RIG-I は表皮ケラチノサイトの増殖と分化の制御機構に関わる可能性があり, RIG-I を介したシグナルの解析を通じて, ウイルスや癌に対する IFN 療法や炎症疾患に対する抗 TNF- α 製剤において, 副作用を軽減し, 効果的治療ができるような方法の開発が期待される。

謝 辞

本研究は文部科学省の科学研究費並びに, 公益信託おもり高度先進医療基金助成金 (健吾ちゃん基金) の助成を受けて行いました。また, 薬剤学講座の早狩誠教授のご指導, 及び皮膚科学講座の武田仁志先生, 六戸大樹先生, 豊巻由香技術員のご協力に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
- 2) Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.
- 3) Shuman S. Vaccinia virus RNA helicase: an

- essential enzyme related to the DE-H family of RNA-dependent NTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10935-9.
- 4) Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005;79:2689-99.
- 5) Decker T, Kovarik P, Meinke A. GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:121-34.
- 6) Imaizumi T, Yagihashi N, Hatakeyama M, Yamashita K, Ishikawa A, Taima K, Yoshida H, et al. Expression of retinoic acid-inducible gene-I in vascular smooth muscle cells stimulated with interferon- γ . *Life Sci* 2004;23:1171-80.
- 7) Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106:761-71.
- 8) Kitamura H, Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Imaizumi T, Satoh K, Hanada K. Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2007;45:127-34.
- 9) Skurkovich SV, Skurkovich B, Kelly JA. Anticytokine therapy--new approach to the treatment of autoimmune and cytokine-disturbance diseases. *Med Hypotheses* 2002;59:770-80.
- 10) Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor- α induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NF- κ B and C/EBP β . *J Biol Chem* 2000;275:32077-88.
- 11) Chen SH, Arany I, Apisarnthanarax N, Rajaraman S, Tyring SK, Horikoshi T, Brysk H, et al. Response of keratinocytes from normal and psoriatic epidermis to interferon- γ differs in the expression of zinc- α (2)-glycoprotein and cathepsin D. *FASEB J* 2000;14:565-71.
- 12) Jackson M, Howie SE, Weller R, Sabin E, Hunter JA, McKenzie RC. Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1 α activation in response to γ -IFN. *FASEB J* 1999;13:495-502.
- 13) Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, et al. Epithelial overexpression of interleukin-32 α in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2007;149:480-6.
- 14) Yeruva S, Ramadori G, Raddatz D. NF- κ B-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1 β and IFN- γ in human intestinal epithelial cell lines. *Int J Colorectal Dis* ; 2007 Nov 28 [Epub ahead of print in press.]