

原著

## 中波長紫外線(UVB)はヒト表皮細胞の RETINOIC ACID-INDUCIBLE GENE-I 発現誘導を抑制する

木村 一之<sup>1)</sup> 松崎 康司<sup>1)</sup> 北村 英夫<sup>1)</sup>  
赤坂 英二郎<sup>1)</sup> 六戸 大樹<sup>1)</sup> 中野 創<sup>1)</sup>  
今泉 忠淳<sup>2)</sup> 佐藤 敬<sup>2)</sup> 澤村 大輔<sup>1)</sup>

**抄録** Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)はウイルスの二本鎖 RNA を認識し type I interferon (IFN)の産生を誘導する細胞質蛋白である。ヒト表皮細胞では RIG-IはIFN- $\gamma$  および tumor necrosis factor- $\alpha$  刺激によって誘導される。今回我々は、表皮への代表的な外的刺激であるウイルス感染と紫外線がヒト表皮細胞での RIG-I 発現に与える影響について検討した。擬似的ウイルス感染を生じる polyinosinic-polycytidylic acid を用いてヒト表皮細胞を刺激すると RIG-I の発現増強が認められたが、この発現増強と非刺激時の RIG-I 基礎発現量は中波長紫外線(UVB)照射によって抑制された。このことより UVB が RIG-I 発現抑制を介して皮膚免疫の低下を促し、皮膚におけるウイルス感染やその再活性化の誘導に関与している可能性が示唆された。

弘前医学 62:1-6, 2011

キーワード: retinoic acid-inducible gene-I; poly(I:C); 表皮細胞; 中波長紫外線。

ORIGINAL ARTICLE

## ULTRAVIOLET B IRRADIATION INHIBITS RETINOIC ACID-INDUCIBLE GENE-I EXPRESSION IN HUMAN KERATINOCYTES.

Kazuyuki Kimura<sup>1)</sup>, Yasushi Matsuzaki<sup>1)</sup>, Hideo Kitamura<sup>1)</sup>,  
Eijiro Akasaka<sup>1)</sup>, Daiki Rokunohe<sup>1)</sup>, Hajime Nakano<sup>1)</sup>,  
Tadaatsu Imaizumi<sup>2)</sup>, Kei Satoh<sup>2)</sup> and Daisuke Sawamura<sup>1)</sup>

**Abstract** Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is a cytoplasmic protein that recognizes viral double-stranded RNA to induce the type I interferon (IFN) response. In human keratinocytes, RIG-I is induced by IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation. This study investigated the effects of extraneous stimuli including viral infection and UVB exposure on the RIG-I expression in human keratinocytes. Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)), which mimics viral infection, significantly induced the RIG-I expression, while UVB inhibited the basal RIG-I expression as well as the poly(I:C)-induced RIG-I overexpression in cultured human keratinocytes. Thus, suppression of the RIG-I expression caused by UVB exposure may partly explain the inhibition of skin-based immune responses, leading to viral infection and recrudescence.

Hirosaki Med. J. 62:1-6, 2011

**Key words:** retinoic acid-inducible gene-I; poly(I:C); keratinocytes; UVB.

<sup>1)</sup> 弘前大学大学院医学研究科皮膚科学講座

<sup>2)</sup> 弘前大学大学院医学研究科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: 松崎康司  
平成22年12月3日受付  
平成23年1月5日受理

<sup>1)</sup> Department of Dermatology, Hirosaki University  
Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan

<sup>2)</sup> Department of Vascular Biology, Institute of Brain  
Science, Hirosaki University Graduate School of  
Medicine, Hirosaki, Japan

Correspondence: Y. Matsuzaki

Received for publication, December 3, 2010

Accepted for publication, January 5, 2011

## 緒 言

生物の最外層に位置する皮膚は、ウイルス感染や紫外線といった外的刺激に常に曝されているが、皮膚の生体防御機構が働き恒常性は維持されている。その重要な役割を果たす表皮細胞は皮膚表層を構成し、サイトカインおよびケモカインを産生するなど免疫機構に関与している。ウイルス感染は皮膚病変を生じうる一般的な皮膚障害刺激のひとつであるが、ウイルス由来 DNA または RNA は、主に細胞膜に存在するレセプターである Toll-like receptors (TLRs) によって認識される<sup>1)</sup>。ウイルス感知レセプターに病原体が結合すると抗ウイルス作用をもつサイトカインが産生され、免疫反応のシグナル伝達経路が作動する<sup>2,3)</sup>。

TLRs ファミリーのひとつである TLR3 はヒト表皮細胞で発現しており、ウイルス感染細胞から放出されるウイルスの double-stranded RNA (ds-RNA) を認識し、interferon regulatory factor-3 および nuclear factor- $\kappa$ B を介した経路を活性化することによって皮膚の免疫反応の一部を担っている<sup>4)</sup>。

近年、細胞質内でウイルス由来 ds-RNA を認識するレセプターとして retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) が同定された<sup>5)</sup>。RIG-I は DexH/D-box ファミリーに属する RNA ヘリカーゼ分子であり、RNA ウイルスに対する免疫反応など細胞内における種々の役割を果たしている<sup>6,7)</sup>。RIG-I は、C 末端側にヘリカーゼドメインを、N 末端側に caspase recruitment domain と呼ばれるシグナル伝達に関するドメインを二回繰り返して持つ特異的な構造を有している。C 末端側で ds-RNA を認識すると N 末端側を介して下流のシグナル伝達経路を活性化させると考えられている<sup>8)</sup>。

我々はこれまでにヒト表皮細胞で interferon (IFN)- $\gamma$  および tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  刺激によって RIG-I の発現が増強されること、更には免疫組織化学的に炎症性皮膚疾患である尋常性乾癬患者の病変部皮膚において、有棘層および基底層で RIG-I が高発現していることを明らかにした<sup>9)</sup>。これらのことから RIG-I は自然免疫に関わる RNA ヘリカーゼだけではなく、炎症性疾患におけるサイトカインネットワークのメディエー

ターとしても機能している可能性が示唆された<sup>9)</sup>。

一方、中波長紫外線 (UVB) 照射は皮膚老化や皮膚癌をはじめとする皮膚障害の要因のひとつであり、また皮膚の免疫機構に対しては抑制的に作用すると考えられている<sup>10-12)</sup>。代表的な例としてはヘルペス口唇炎の再燃が挙げられる。Herpes simplex virus type1 (HSV-1) は口腔に感染し、表皮に水疱局面を形成、その後は神経節に終生潜在するとされている。紫外線曝露のような特定の刺激の後に再活性化し、ヘルペス口唇炎が生じると考えられており、UVB が局所免疫を抑制することを示唆している。

我々はヒト表皮細胞における RIG-I 発現に UVB が影響を与えることによって局所免疫の抑制が生じるのではないかと推測し、本研究で解析した。

## 実験材料と方法

**【細胞と刺激】** 今回の実験にはヒト表皮細胞株である HaCaT 細胞を用いた。HaCaT 細胞は 10% ウシ胎児血清、炭酸水素ナトリウム (2 mg/ml)、ペニシリン (100  $\mu$ g/ml)、ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml)、アンホテリシン B (2.5 mg/ml) を添加した minimum essential medium 培地を用い、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。60% の細胞濃度になった時点で PBS 溶液で 2 回細胞を洗浄し、12 時間後に各種濃度に調整した polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) を添加した。UVB は HaCaT 細胞を PBS に浸した状態で 2 本の FL20S-E ランプ (Toshiba, Tokyo, Japan) を用いて照射し、照射後は照射前と同様の培地で培養した。UVB の紫外線強度は UVR-3036/S2 (Clinical Supply, Tifunashima, Japan) で測定した。UVB と poly(I:C) 同時刺激の細胞群は UVB 照射後、poly(I:C) を添加した培地で培養した。

**【RT-PCR】** RNA の抽出は RNeasy total isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行った。抽出された RNA は RNA PCR kit (AMV) Ver.3.0 (Takara, Kyoto, Japan) を用いて逆転写反応を行った。RIG-I と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の cDNA 合成のためのプ

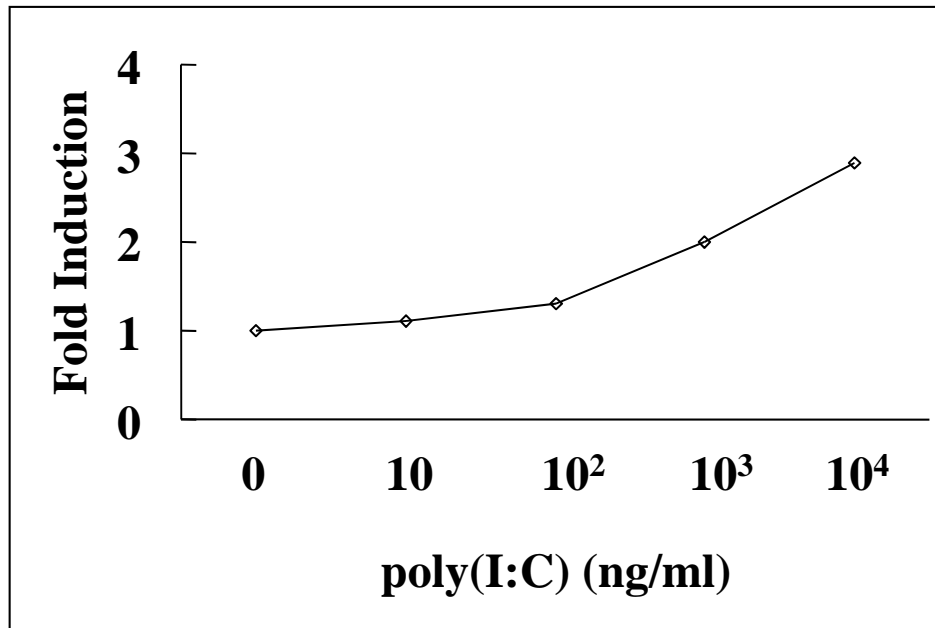


Fig. 1 Poly(I:C)によるヒト表皮細胞内 RIG-I 発現誘導

HaCaT 細胞は各種濃度の poly(I:C)を添加, または非添加の状態 で 6 時間培養, 濃度依存的に RIG-I 発現が確認された.

ライマーは以下の配列のものを使用した.

RIG-I-F:(5'-GCATATTGACTGGACGTGGC  
A-3'),

RIG-I-R:(5'-CAGTCATGGCTGCAGTTCTG  
TC-3'),

GAPDH-F:(5'-CCACCCATGGCAAATTCC  
ATGGCA-3'),

GAPDH-R:(5'-TCTAGACGGCAGGTCA  
GGTCCACC-3').

RIG-I cDNA の反応条件は(94°C, 1 min) 1 サイクル, (94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 1 min)を 25 サイクル, (72°C, 10 min)を 1 サイクルで行った. 生成された PCR 産物は ethidium bromide 含有 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行った. また, RIG-I と GAPDH のバンドはそれぞれ 644 bp と 598 bp である. バンドのコントロールとしては GAPDH を用い, 半定量化は Scion Image 4.0.2 analysis software を使用した.

## 結 果

### 表皮細胞における poly(I:C)による RIG-I の

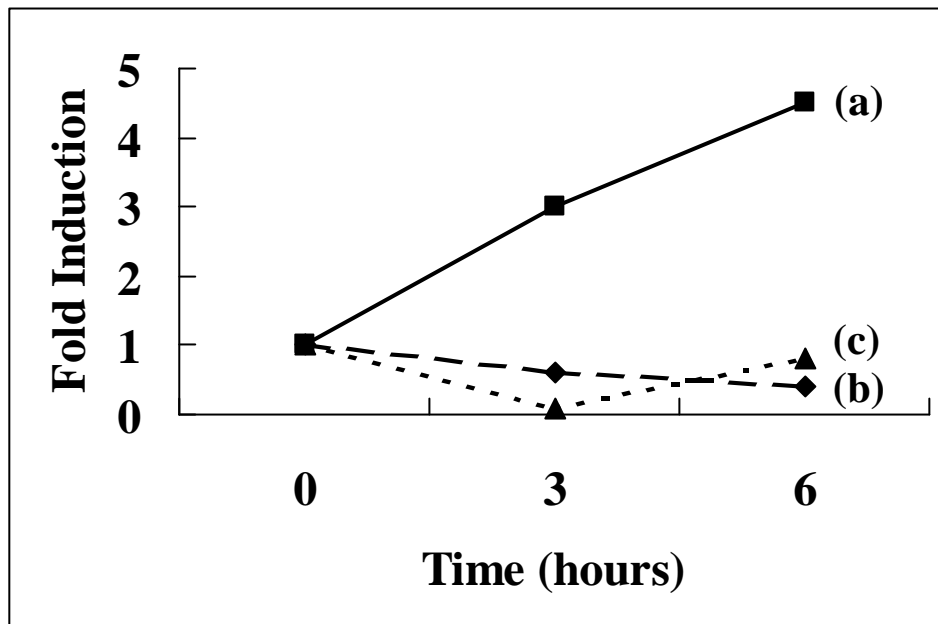
### 発現誘導

我々はこれまでに培養ヒト表皮細胞である HaCaT 細胞において IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  刺激によって RIG-I が濃度依存性に発現することを明らかにした. そこで, ウイルス感染刺激によってヒト表皮細胞が抗ウイルス作用をもつ RIG-I を発現するか検討した. まず, 種々の濃度の poly(I:C) で HaCaT 細胞を刺激し, 刺激後 6 時間の RIG-I 発現を RT-PCR にて確認したところ, mRNA レベルでは 10<sup>3</sup> および 10<sup>4</sup> ng/ml の poly(I:C) 刺激で著明な発現の増強が見られた(Fig. 1).

### UVB 照射の RIG-I 発現抑制効果

Poly(I:C) 刺激による RIG-I 発現の経時的変化の検討を行ったところ mRNA レベルでは poly(I:C) (10<sup>4</sup> ng/ml) で刺激後 3 時間で RIG-I 発現の増強がみられ, 刺激後 6 時間で発現はピークに達した(Fig. 2).

次に RIG-I と対照的にヒト表皮細胞に対して免疫抑制の作用を持つとされている UVB 照射がヒト表皮細胞での RIG-I の発現に与える影響を調べた. HaCaT 細胞を UVB (30 mJ/cm<sup>2</sup>) で刺激し, 刺激後の RIG-I 発現の経時的変化を観察したとこ



**(a): poly(I:C) 10<sup>4</sup> ng/ml**

**(b): UVB 30 mJ/cm<sup>2</sup>**

**(c): poly(I:C) 10<sup>4</sup> ng/ml + UVB 30 mJ/cm<sup>2</sup>**

Fig. 2 UVB の RIG-I 発現に与える影響

HaCaT 細胞に対して以下の刺激を加えた。

(a) poly(I:C) 10<sup>4</sup> ng/ml, (b) UVB 30 mJ/cm<sup>2</sup>, (c) poly(I:C) 10<sup>4</sup> ng/ml と UVB 30 mJ/cm<sup>2</sup> の同時刺激。刺激 3 時間後, 6 時間後に RNA を細胞から抽出し, RT-PCR にて RIG-I と GAPDH を増幅した。

Poly(I:C) 誘導性 RIG-I 発現は UVB 照射により抑制された。

ろ, RIG-I の mRNA 発現は刺激後 3 時間で抑制された (Fig. 2)。

以上の結果を踏まえた上で, UVB (30 mJ/cm<sup>2</sup>) と poly(I:C) (10<sup>4</sup> ng/ml) の同時刺激を行ったところ, poly(I:C) 刺激によって生じる RIG-I の発現増強は UVB 照射によって阻害され, 同時刺激 3 時間後に RIG-I の発現は最も低下していた (Fig. 2)。

## 考 察

RIG-I は様々な細胞において TLR3 とは独立した経路で RNA ウイルスの ds-RNA を認識し, IFN の産生を促す細胞内タンパク質であること

が知られている<sup>8,13,14</sup>。RIG-I ノックアウトマウスの線維芽細胞や樹状細胞では野生型マウスに比べて RNA ウイルス感染に対して IFN- $\gamma$  産生能力が損なわれている<sup>15</sup>。我々は, ヒトの表皮細胞において RIG-I が TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  によって濃度依存性に発現が増強することを明らかにした<sup>9</sup>。今回の研究で, 擬似的ウイルス感染状態をもたらす poly(I:C) はヒト表皮細胞における RIG-I 発現の強力な濃度・時間依存性のアゴニストであることが明らかになった。さらに UVB 照射がヒト表皮細胞における RIG-I の基礎発現量のみならず, poly(I:C) によって生じる RIG-I の発現増強まで抑制することが判明した。

UVB 照射の表皮に与える影響は表皮の細胞免

疫抑制や皮膚感染症の再活性化という形で良く知られている<sup>10, 16)</sup>。今回の結果から UVB は RIG-I 発現を抑制することによってウイルス感染時の RIG-I を介する免疫反応を抑制することが推察された。

HSV-1 は普段は三叉神経節の内部に潜在しているが、ある刺激が加わり再活性化すると皮膚病変を引き起こす。さらに、HSV-1 に感染した細胞中には ds-RNA が蓄積しており、それによって線維芽細胞やマクロファージで RIG-I が HSV-1 感染を感知し type I IFN の発現が誘導されると考えられている<sup>17, 18)</sup>。

また、HSV-1 の再燃は日光照射を含む種々の刺激によって生じるとされている。我々は今回の研究で UVB 照射がヒト表皮細胞において poly (I:C) 刺激による RIG-I の発現増強を強力に抑制することを明らかにした。この結果から HSV-1 の再活性化には、UVB 照射によって生じる RIG-I の発現抑制に伴う免疫機構の破綻が関与していることが推測される。

結論であるが、本実験結果より現在まで不明とされていたヒト表皮細胞における RIG-I による自然免疫の調節機構の一部が明らかになった。また、UVB 照射はこれらの機構を著明に抑制し、局所免疫の機能不全およびウイルスの感染や再活性化をもたらすと推測される。

## 謝 辞

皮膚科学講座の豊巻由香技術員、田村由起子、鷹木由里子、清藤奈菜子実験助手のご協力に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Lee MS, Kim YJ. Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space. *Mol Cells* 2007;23:1-10.
- 2) Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
- 3) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
- 4) Sankar S, Chan H, Romanow WJ, Li J, Bates RJ. IKK-i signals through IRF3 and NFkappaB to mediate the production of inflammatory cytokines. *Cell Signal* 2006;18:982-93.
- 5) Kalali BN, Köllisch G, Mages J, Müller T, Bauer S, Wagner H, Ring J, et al. Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J Immunol* 2008;181:2694-704.
- 6) Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-72.
- 7) Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB. T cells in psoriatic lesional skin that survive conventional therapy with NB-UVB radiation display reduced IFN-gamma expression. *Arch Dermatol Res* 2004;295:509-16.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Chapman RS, Cooper KD, De Fabo EC, Frederick JE, Gelatt KN, Hammond SP, Hersey P, et al. Solar ultraviolet radiation and the risk of infectious disease: summary of a workshop. *Photochem Photobiol* 1995;61:223-47.
- 11) Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 1996;379:335-9.
- 12) Katsambas A, Nicolaidou E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments



- in epidemiology. *Arch Dermatol* 1996;132:444-50.
- 13) Imaizumi T, Hatakeyama M, Yamashita K, Ishikawa A, Yoshida H, Satoh K, Taima K, et al. Double-stranded RNA induces the synthesis of retinoic acid-inducible gene-I in vascular endothelial cells. *Endothelium* 2005;12:133-7.
- 14) 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.
- 15) Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-5.
- 16) Kripke ML. Photoimmunology. *Photochem Photobiol* 1990;52:919-24.
- 17) Rasmussen SB, Jensen SB, Nielsen C, Quartin E, Kato H, Chen ZJ, Silverman RH, et al. Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J Gen Virol* 2009;90:74-8.
- 18) Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* 2006;80:5059-64.