

病原体由来および自己由来二本鎖 RNA がインターフェロン非依存的にコラーゲン産生を抑制する機構の解明

大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野

櫻井 文教

Production of extracellular matrices, including collagen and fibronectin, is highly important for not only beauty and moisturizing, but also biological defense system, such as maintenance of barrier ability and anti-inflammatory responses, in the skin. Dermal fibroblasts mainly produce extracellular matrices in the skin. Therefore, regulation of extracellular matrix production in the dermal fibroblasts is highly important. We previously found that double-stranded RNA (dsRNA) suppressed the expression of extracellular matrices in the activated hepatic satellite cells. Dermal fibroblasts are also exposed to not only pathogen-derived dsRNA but also endogenous dsRNA. These findings made us hypothesize that pathogen-derived and endogenous dsRNA activated innate immune responses in the skin fibroblasts, leading to reduction in extracellular matrix production in the skin. In this study, treatment with a synthetic dsRNA, polyI:C, resulted in significant reduction in the expression of extracellular matrices, without significant reduction in the viabilities of normal human dermal fibroblasts. Furthermore, a short dsRNA (19 bp) also induced down-regulation of fibrotic marker gene expression in normal human dermal fibroblasts. These results indicated that dsRNA is a hazard for skin by down-regulating the production of extracellular matrices.

1. 緒言

皮膚におけるコラーゲンやファイブロネクチンなどの細胞外マトリックスの産生は、皮膚の美容・保湿のみならず、バリア能の維持や抗炎症応答などの生体防御機構に極めて重要である¹⁾。皮膚において細胞外マトリックスは、主に線維芽細胞が産生しているが、線維芽細胞においては Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad シグナルが細胞外マトリックスの産生・分解制御に重要な役割を果たしている²⁾。したがって皮膚の健康・恒常性を保つためには細胞外マトリックスの産生・分解を適切に制御する必要があり、そのためには TGF- β /Smad シグナルの制御が重要と考えられる。

著者らは近年、肝線維化などの線維化治療に関する研究に取り組んでいる。線維化では、各組織の線維芽細胞において TGF- β /Smad シグナルが過剰に活性化し、細胞外マトリックスが過剰産生され蓄積することが原因となっている³⁾。線維化は、肝臓のみならず皮膚、腎臓、肺などあらゆる部位で発症し、多くの患者が苦しんでいるにもかかわらず、効果的な治療薬が極めて少ないことから、アンメットメディカルニーズの高い疾患となっている。著者は、活性化した肝星細胞(肝臓に局在する間葉系細胞で、肝線維化の原因となる細胞)に、合成二本鎖 RNA であ

る polyI:C や二本鎖 RNA をゲノムに持つレオウイルスを作用させることで、1 型インターフェロン (IFN) 非依存的に、TGF- β /Smad シグナルおよびコラーゲン産生を抑制し、線維化を解消することに成功した。

近年、皮膚も日常生活のなかで、様々な二本鎖 RNA に暴露されている。皮膚は、ウイルスや細菌など病原体に常に暴露されているが、ウイルスや一部の細菌は二本鎖 RNA を多量に産生する。また、ケラチノサイトでは紫外線照射により snRNA などのノンコーディング RNA が変性したのち放出され、二本鎖 RNA として Toll-like receptor 3 (TLR3) を介して炎症応答を誘導する⁴⁾。さらに最近では、ミトコンドリア DNA より二本鎖 RNA が産生させることが報告されている⁵⁾。このような背景から、皮膚の線維芽細胞などが、病原体もしくは自己由来の二本鎖 RNA に暴露することによって、1 型 IFN 非依存的に TGF- β /Smad シグナルが抑制され、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生抑制や分解促進、ひいては皮膚の保湿・バリア能が低下するのではないかと考えた。そこで本研究では、病原体由来および自己由来の二本鎖 RNA による I 型 IFN 非依存的な細胞外マトリックス産生抑制の評価、およびそのメカニズム解明を目的として検討を行った。

2. 方法

2.1. 細胞培養

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞は、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (High glucose) (10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics 含有) で培養した。ヒト肝星細胞株である LX-2 細胞は、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (High glucose) (2% FBS, antibiotics 含有) で培養した。実験の際には、12 時間 FBS 非含有培地



Elucidation of mechanism of suppression of collage production by pathogen-derived and endogenous double-stranded RNA in an interferon-independent manner

Fuminori Sakurai

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

で培養したのち、TGF-βを終濃度2ng/mlで添加し16時間培養したのちに実験に使用した。尚、使用したFBSは、56℃、30分間の非働化処理を行った後に使用した。

2.2. レオウイルスの調製

レオウイルスをL929細胞に感染させ、2日後に細胞を回収・遠心後、HO buffer (1M Tris-HCl (pH7.5)、5M NaCl、10mM 2-mercaptoethanol) に懸濁した。超音波処理を4秒間行ったのち、凍結融解により細胞を破壊した。得られた細胞破砕液に、Vertrel (三井・デュポン フロロケミカル) を全液量の2/5加え、超音波処理を4秒間行い、さらに、同量のVertrelを加えて超音波処理を4秒行なった。これを9,000g、5分間遠心し、上清を新しいチューブに回収した。回収した液量の9/10量のVertrelを加えたのち、超音波処理を行い、9,000g、10分間遠心し、上清を回収した。超遠心機のスウィング・ローターのチューブに比重1.44g/cm³、1.22g/cm³の塩化セシウム溶液を順に重層し、その上に上記のレオウイルス懸濁液を加えて超遠心機を用いて27,000rpm、5.5時間遠心した。その後、レオウイルスのバンドを回収し、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% glycerolからなる透析バッファーで1時間、4℃で透析し、透析バッファーを交換した後、一晚透析した。回収した懸濁液をレオウイルス懸濁液として回収した。

2.3. 二本鎖RNAおよびウイルス作用

合成二本鎖RNAであるpolyI: Cを培地中に添加、もしくはLipofectamine RNAiMAXを用いてTransfectionした。また二本鎖RNAをゲノムに有するレオウイルスをMultiplicity of infection (MOI) 20、100で作用させた。19塩基長の短い二本鎖RNA (short dsRNA; sdsRNA) は、Lipofectamine RNAiMAXを用いてTransfectionした。

2.4. 細胞生存率の評価

正常ヒト成人皮膚線維芽細胞を1 × 10⁴ cells/wellで96well plateに播種した。翌日、polyI: C、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体、sdsRNAおよびレオウイルスを作用した。作用48時間後にWST-8アッセイにより細胞生存率を評価した。

2.5. 遺伝子発現解析

上記と同様に、polyI: C、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体、sdsRNA/Lipofectamine RNAiMAX複合体、およびレオウイルス作用48時間後にtotal RNAを回収し、定量的RT-PCRにより遺伝子発現解析を行った。また同様に蛋白質を回収し、Western blottingにより蛋白質発現解析を実施した。用いた抗体は以下の通りである。Anti-α-smooth muscle actin (α-SMA) antibody (Abcam,

1:1000), anti-β-actin antibody (Sigma-aldrich, 1:2500)。

3. 結果

まずはじめに正常ヒト皮膚線維芽細胞に二本鎖RNAおよびレオウイルス作用後の細胞生存率を検討した。polyI: C単独、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体、およびレオウイルスを作用させたところ、用いた用量の範囲においては、正常ヒト線維芽細胞の細胞生存率に有意な低下は観察されなかった(図1)。そこで次に、ヒト線維芽細胞におけるコラーゲンやファイブロネクチンなどの細胞外マトリックスの遺伝子発現量を検討したところ、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体群において、有意な低下が観察された(図2)。またELISAによって培養上清中のIFN-β産生量を検討したところ、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX群でのみ、有意なIFN-β産生が観察された(図3)。

次に同様の研究を短い塩基長のdsRNA (short dsRNA; sdsRNA) を用いて検討を行った。その結果、これらのsdsRNA作用時においてヒト皮膚線維芽細胞の細胞生存率の低下は観察されなかった。さらにこれらのsdsRNAにおいても、sdsRNAの濃度依存的に線維化マーカーの発現が有意に低下した。さらにWestern blottingによって様々な線維化マーカーの発現を解析したところ、こちらにおいても線維化マーカーの発現が低下した。さらにsdsRNAによる線維化マーカーの発現低下は、1型IFNの産生が抑制された条件下においても観察された。上記と同様の結果は、ヒト肝星細胞株であるLX-2細胞でも観察された。以上の結果より、二本鎖RNAは皮膚における細胞外マトリックスの産生を抑制することが示唆された。

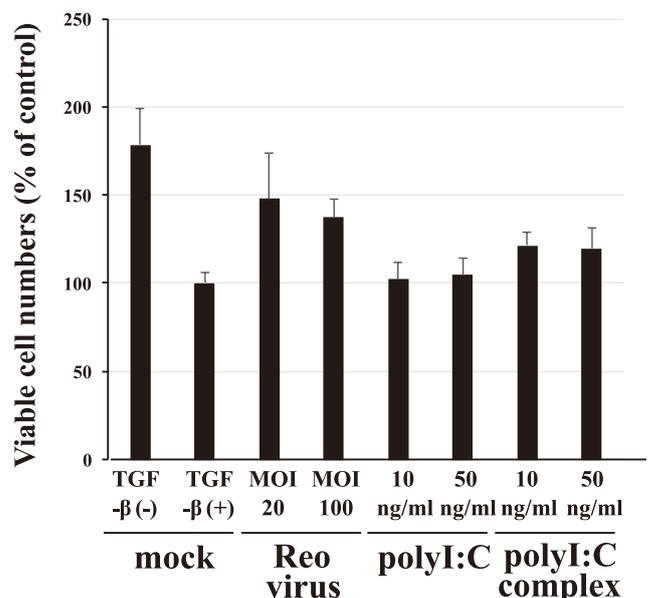


図1 polyI: C, polyI: C/Lipofectamine RNAiMax複合体、Reovirus作用後の正常ヒト皮膚線維芽細胞の細胞生存率

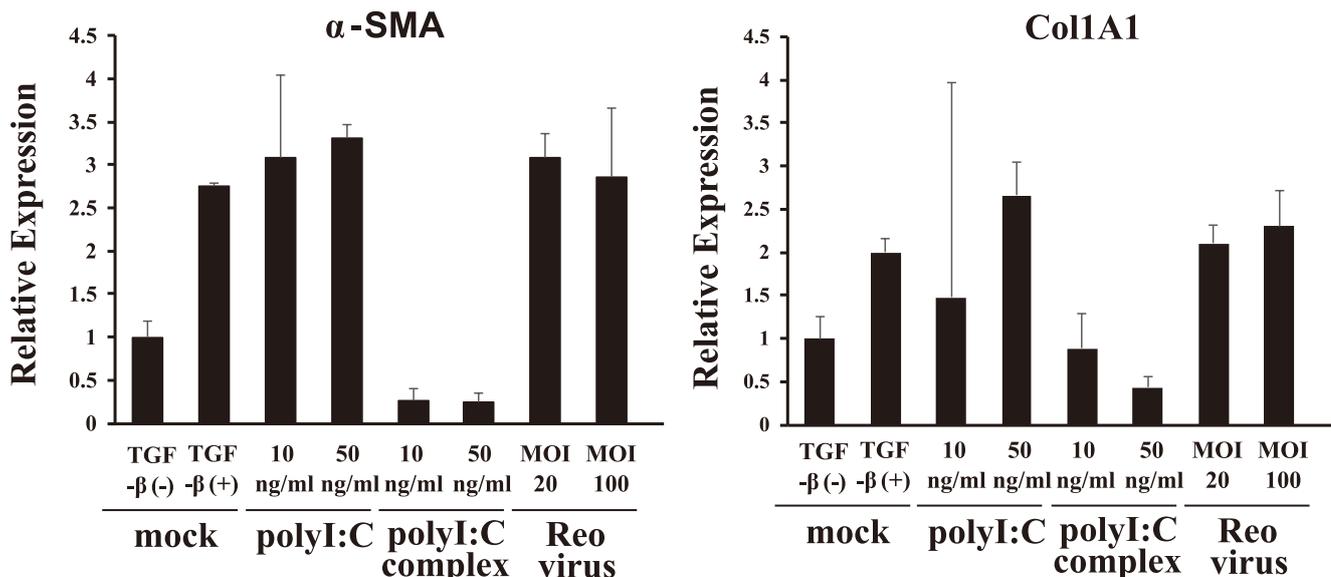


図2 polyI: C, polyI: C/Lipofectamine RNAiMax 複合体、Reovirus 作用後の正常ヒト皮膚線維芽細胞における線維化マーカーの発現レベル。TGF- β 非作用群の値を1とした。

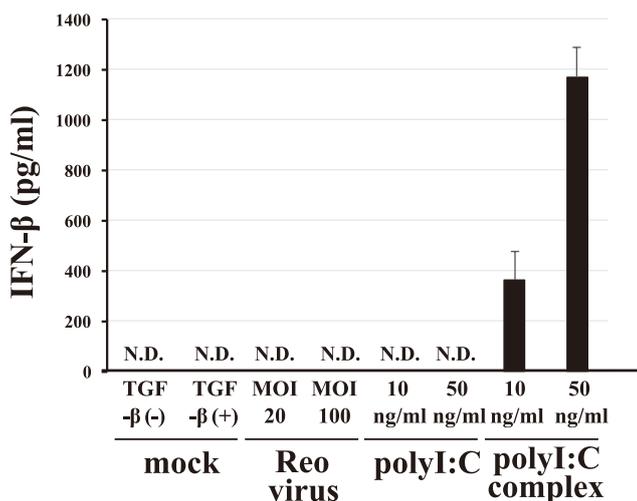


図3 polyI: C, polyI: C/Lipofectamine RNAiMax 複合体、Reovirus 作用後の正常ヒト皮膚線維芽細胞における IFN- β 産生量

4. 考察

今回、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX 複合体作用群において細胞外マトリックス遺伝子の発現が有意に低下した。細胞生存率については有意な低下は観察されなかったことから、この細胞外マトリックス遺伝子の発現低下は、細胞毒性によるものではないと考えられる。実際に、ハウスキーピング遺伝子の発現にも変化は見られなかった。

今回、レオウイルスおよびpolyI: C単独作用群においては、細胞外マトリックス遺伝子の有意な低下は観察されなかった。これは、細胞内に取り込まれたpolyI: Cやレオウ

イルスの量が少なかったためと考えられる。レオウイルスの感染受容体は、Junction adhesion molecule-A (JAM-A) であるが、線維芽細胞ではJAM-Aの発現が低いことが知られている。そのため、レオウイルスの細胞内取り込み量が少なかったと考えられた。

今回の二本鎖RNAによる線維化マーカー遺伝子の発現抑制メカニズムであるが、二本鎖RNAが何らかの細胞側因子に認識されることで誘導されているものと予想される。実際に種々の細胞側因子をsiRNAを用いてノックダウンしたが、関与する分子の同定には至らなかった。現在、さらに多くの標的遺伝子をノックダウンし、検討を継続している。

(引用文献)

- 1) Chambers, E. S. & Vukmanovic-Stejić, M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* **160**, 116-125 (2020).
- 2) Flanders, K. C. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* **85**, 47-64 (2004).
- 3) Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *Journal of Experimental Medicine* **217**, e20190103 (2020).
- 4) Bernard, J. J. *et al.* Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* **18**, 1286-1290 (2012).
- 5) Ren, B., Guan, M.-X., Zhou, T., Cai, X. & Shan, G. Emerging functions of mitochondria-encoded noncoding RNAs. *Trends in Genetics* **39**, 125-139 (2023).