

# ヒアルロン酸とデスモソームタンパクとの新規結合が皮膚機能に及ぼす影響の解明

大阪公立大学医学研究科病態生理学

高杉 征樹

Hyaluronan (HA), a linear polysaccharide and a major component of the extracellular matrix, plays a role in supporting tissue structure and regulating cellular signaling pathways depending on its size. Here, we identified proteins that are associated with HA in the extracellular space and found that desmosome proteins, especially desmoplakin, were associated with HA. Our results suggest that HA is associated with desmoplakin in the blood, where HA is partially degraded. However, although such low molecular weight (LMW) HA is considered to be pro-inflammatory based on many *in vitro* studies, mouse transplanted with LMW-HA-releasing capsule did not show any differences in the transcriptome of liver, kidney, and spleen after 1 week of transplantation. In order to reveal the role of association between HA and desmoplakin, we need to understand the function of LMW HA and thus we generated transgenic mouse that has extra copy of hyaluronan synthase 2 (HAS2) gene. Long-term evaluation of this transgenic mouse will lead to understanding of the function of LMW-HA in the blood, and will ultimately allow us to investigate the role of association of hyaluronan and desmoplakin.

## 1. 緒言

ヒアルロン酸 (Hyaluronan : HA) は直鎖状のグリコサミノグリカンで細胞外マトリックスの主要な構成要素の一つであり、高分子ポリマーとして主に皮膚・筋肉・支持組織中に存在している。これらの高分子HAは高い保水作用を有し構造的な役割を果たすだけでなく、CD44などの受容体との結合により制御されるシグナル伝達を介して様々な細胞機能を調節している。HAは肌に弾力を与える成分として、既に化粧品や美容品に広く用いられている物質であり、その保水作用に留まらない複雑な生理作用が詳細に解明されればHAの利用を最適化し、これを含む化粧品や美容品の改善に繋げていく事が可能となる。重要な事に、HAが細胞に及ぼす機能はそのポリマー長(分子量)に大きく依存する。

しかし、ヒアルロン酸の大きさを規定するのは、単一のヒアルロン酸分子のポリマー長だけではない事が近年明らかになりつつある。生体内の細胞外マトリックス中のHAはタンパク質による架橋を受ける場合があり<sup>1)</sup>、したがってHAとタンパクの相互作用を包括的に捉える事がHAの生体機能を正しく理解する上で重要である。我々は細胞培養上清においてHAと結合する細胞外マトリックス成分を質量分析により初めて網羅的に解析し、デスモソーム構成因子、特にデスモプラキンが強くHAと結びついている事を見出した。興味深い事にデスモソームは接着斑とも呼ば

れ、表皮の細胞接着に重要な役割を果たし、HA同様皮膚中に多く存在している事が知られている。細胞内においてデスモプラキンはデスモコリンやデスモグレインといった細胞接着分子と中間径フィラメントを結びつける役割を果たしている。このようにデスモプラキンは主には細胞内で機能すると考えられているものの、一方で意義は不明ながらデスモプラキンは細胞外マトリックス中にも存在する事が確認されている<sup>2)</sup>。細胞外に放出されたデスモプラキンは多量体化する場合、デスモプラキンを介してHAが架橋され、その事によってHAの大きさが変化し機能にまで変化が生じる可能性が考えられる。また基本的に細胞内に存在するデスモプラキンは一部細胞外にも存在しているように、通常細胞外に存在するヒアルロン酸についても一部細胞内に存在している事が報告されている<sup>3)</sup>。したがって、細胞内におけるHAとデスモプラキンなどのデスモソーム構成タンパクとの結合がデスモソームの形成や機能に影響を及ぼしている可能性も考えられる。そこで本研究では細胞外マトリックスにおけるタンパク質との相互作用に基づくHAの機能調節の実態、および細胞内のHAの意義を明らかにし、それらの皮膚機能との関係を解明する事を目指した。

## 2. 方法

### 2.1. HEK293T細胞の培養とトランスフェクション

HEK293T細胞はATCCより入手し、10% FBSを含むDMEMの中で37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養を行った。デスモプラキン発現ベクターは、HEK293T細胞よりKOD FX DNAポリメラーゼ (TOYOBO) を用いてクローニングしたデスモプラキン遺伝子をIn Fusion kit (Takara) によってpEF vectorに組み込んだものを使用した。pEF-3xFLAG-デスモプラキンはPEI-Maxを用いてHEK293Tにトランスフェクションし、トランスフェクション後48~72



Investigation of the role of association of hyaluronan and desmosome proteins on skin function

Masaki Takasugi

Department of Pathophysiology, Osaka Metropolitan University Graduate School of Medicine

時間の細胞をスクレーパーで剥がして1% Triton bufferに溶解して細胞ライセートを調製した。

## 2. 2. ELISAによるHAとデスモプラキンの結合の解析

マルチソープ 96 ウェルプレートに10mg/ml、100μlのLMW-HAまたはPBSを分注し、16時間静置しコーティングを行った。0.02% TBSTで1回洗浄後、2% milk/2% Triton-X100 100μLを加え4℃で16時間ブロッキングを行った。pEF-3xFLAG-デスモプラキンをトランスフェクションしたHEK 293 Tをスクレーパーで剥がして2% tritoni bufferに溶解したライセート(タンパク質濃度0.13mg/ml)にHRP-conjugated anti-FLAG antibody (SIGMA)を1:1000倍希釈で添加し4℃で16時間反応させたものをサンプルとし、これをブロッキング液を除いた96ウェルプレートに100μl加えた。4℃で2時間反応させ、2% Triton bufferで4回洗浄を行ったのち、ECL mixture 100μlを加え、発光を計測した。

## 3. 結果

ヒトの皮膚の中でヒアルロン酸が細胞外マトリックス中でどのようなタンパク質と相互作用しているのかを明らかにするため、まず広範に使われる細胞株である正常ヒト線維芽細胞IMR90を通常のEMEM培地中で培養し、そこにビオチン標識したHAを加えて24時間培養を続けた後、培地中でビオチン標識HAに結合しているタンパク質を回収・同定する事を試みた。培地中のビオチン標識HAとそれに付随するタンパク質はストレプトアビジン標識マグネットビーズとマグネットスタンドを用いた沈降法によって回収し、回収されたタンパク質は質量分析によって同定した。コントロールとしてビオチン標識HAでなく同量のビオチンのみを加えて実験を行った結果、コントロールで検出されずビオチン標識HAを用いた場合にのみ検出される

タンパク質を10種類同定した。最もHAとの結合量が多い(質量分析で多く検出された)タンパク質はデスモソームの重要な構成因子であるデスモプラキン (DESP)であり、驚いた事に同定した10種類のタンパク質中4種類のタンパク質がデスモソームの構成因子であった(DESP、PLAK、DSC1、DSG1)。HAとの結合量が2番目に多いタンパク質は既にHAと結合する事が報告されているITIH2であった事から、本実験はHAと結合するタンパク質を確かに回収する事ができていると考えられる。したがってこれらの結果から細胞外マトリックスにおいてHAがデスモソーム構成タンパク質、特にデスモプラキンと相互作用している事が強く示唆された(図1A、B)。デスモソームは細胞内において他のデスモソーム構成タンパクとの結合を介して局所に集積する事が知られており、同様な集合・多量体化が細胞外でも起こっているとすれば、そこに結合するHAも架橋されるものと予想される(図1C)。

しかしながら、1回の質量分析の結果だけでは、実験者の手指上にも多く存在し実験環境におけるコンタミネーションのリスクが比較的大きいと考えられるデスモプラキンが本当にHAと結合しているかどうかを結論する事はできないと考えられた。そこでデスモプラキンとHAとの結合を裏付けるため、HEK 293 T細胞にデスモプラキン発現プラスミドをトランスフェクションしデスモプラキンを一過的に過剰発現させ、そのライセートをビオチン標識HAと混合した後、ビオチン標識HAとそれに結合するタンパク質をストレプトアビジン標識マグネットビーズとマグネットスタンドを用いて回収した。回収されたタンパク質をウェスタンブロットにより解析したところ、デスモプラキンが回収されている事が確認され(図2A)、したがって質量分析の結果を裏付ける事ができた。次に、両者の結合がHAに付加したビオチンに由来する実験的アーティファクトでない事を確認するために、ストレプトアビジンビーズ

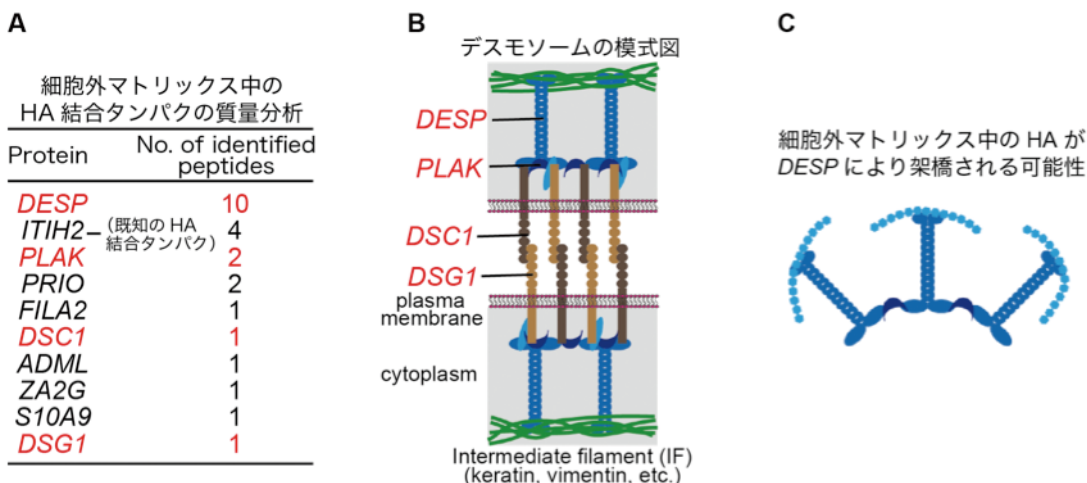


図1 HAと細胞外マトリックスタンパクとの結合

を用いた共沈降実験はなく、プラスチックプレートに無標識のHAを吸着させ、そこにデスモプラキンを過剰発現させたHEK293T細胞のライセートを反応させた。プレート上のHAにトラップされたデスモプラキンの量をELISAにより調べたところ、無標識のHAであってもデスモプラキンを結合させる事が確認できた(図2B)。最後に、デスモプラキンをどのようにして細胞外マトリックスに現れるのかを調べるため、最初に実験に用いたIMR90の遺伝子発現プロファイルをRNA-Seqにより確認したところ、そもそもこの細胞は全くデスモプラキンを発現していない事が分かった。実は、培養上清中のデスモプラキンはFBS由来のものであり、マウスの血清にも同様に多量のデスモプラキが含まれている事が確認できた。実はヒトにおいても、腸で発現するデスモプラキンは血中に流れ込む事が過去に報告されている<sup>4)</sup>。したがって、HAとデスモプラキンの結合はデスモソーム中のデスモプラキが豊富な皮膚など一部の組織に限局して起こっているのではなく、血管の通う全身の組織で起こっているものである事が考えられた。血中のHAは基本的に組織中で生産されたHAが部分的に分解されて生じた比較的小さいものである事が知られており、そのような分子量の小さなHAはしばしば細胞に対して炎症応答を促進させる作用を発揮する事が報告されている。そこで、血中の小分子HAとデスモプラキンの相互作用の生理的意義を探るにあたり、まずは血中小分子HAそのものが生体に及ぼしている影響を評価する事とした。この事を目的として、内容物を徐放する小型のAlzet浸透圧ポンプに高濃度の小分子HAを含むPBSを満たし、マウスの背部に埋め込み、1週間後に解析を行った。マウスの生体内において小分子HAを代謝する役割を担っている肝臓、腎臓、脾臓について、小分子HAを投与したマウスとPBSだけを投与したマウスそれぞれ4個体の遺伝子発現プロファイルをRNA-Seqにより比較したところ、HAの投与により血中のHAレベルは持続的に2倍程度に上昇している事が確認されたにも関わらず、統計

的に有意に発現レベルが変化している遺伝子はなんと一つも認められなかった。しかしながらこの結果は必ずしも血中小分子HAとそのデスモプラキンを結合が無意味である事を意味していない。そこで、1週間の間だけ血中小分子HAのレベルを上昇させてその影響を見ようとするのではなく、ヒアルロン酸合成酵素HAS2をコードする遺伝子を余分に持ち、血中を含め全身でHAレベルが恒常的に上昇しているHAS2トランスジェニックマウスを大阪大学 発生工学研究会の助力を得て作出した。現在、HAS2トランスジェニックマウスの複数の組織でHAS2遺伝子の発現レベルが野生型のマウスに比べ確かに上昇している事の確認を終え、本トランスジェニックマウスを利用した実験の展開に向けて交配によりマウスを増やしている最中である。今後、本マウスが寿命を迎えるまで飼育し、老化、寿命、その他様々な生理機能について評価を進め、まずは血中性分子HAを含むHAの生体内の機能について評価を進め、その後改めてその機能がHAとデスモプラキンの結合によってどのように影響されるかを調べていく事を予定している。

#### 4. 考 察

本研究を通じて、HAとデスモプラキンの結合を裏付ける事ができたという点においては一定の成功を収める事ができたと考えられるものの、デスモプラキが主に結合していると考えられる血中小分子HAについては、それ自体の機能を十分に捉える事ができておらず、今後トランスジェニックマウスを使った多面的な評価をじっくり進めていく必要があり、その結果HAとデスモプラキンの結合が持つ生理機能の解明という本研究の最終目標については、目標に向けて進み続ける事はできているものの、その都度ゴールポストが遠のくといった具合で、まだまだ時間がかかってしまうものと思われる。とはいえ、細胞外マトリックス中のデスモプラキンの由来が血中由来であったことは、HAとデスモプラキンの相互作用が皮膚に限らず全身性に

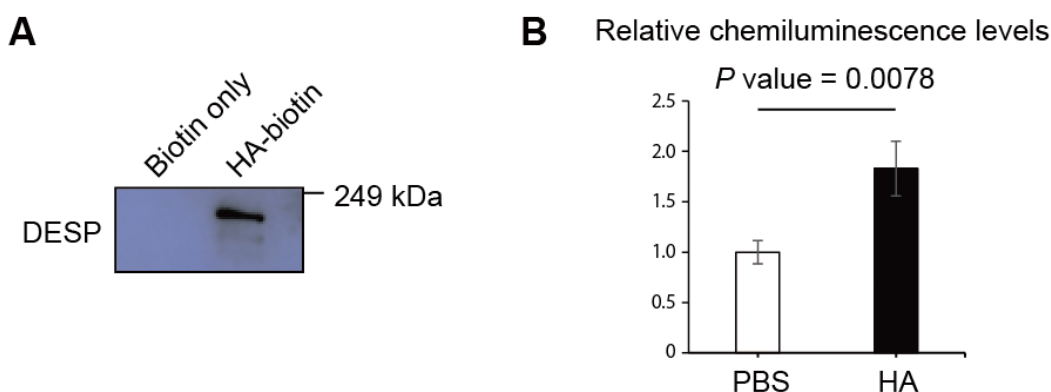


図2

起こりうる事を意味するものであり、本研究の波及効果を高めるものであると考えられる事から、予想外の遅延を生じているとはいえ、研究の有益性が損なわれているという訳ではないと考えられる。また血中小分子HAのレベルはヒトでもマウスでも加齢に伴い大幅に増加していく事が知られており、少なくとも *in vitro* では小分子HAの炎症促進作用が多く研究室で確認されている事から、血中小分子HAの生体内における機能と、それが血中小分子HAとデスモプラキンの結合によってどう調節されるかを明らかにする事ができれば、高齢化社会が進む中で重要性が高まりつつある抗加齢医学の発展にも寄与できる可能性が考えられる。今後HAS2トランスジェニックマウスを用い血中小分子HAレベルが長期にわたって上昇した場合にマウスに生じる影響を明らかにし、それに基づいて血中小分子HAの機能がデスモプラキンの結合によりどのように影響されるかを評価していく。

## 5. 総括

本研究を通じて細胞外のHAが同定しているタンパク質を明らかにし、HAが特にデスモプラキンを始めとするデスモソーム構成タンパクと結合している事が複数の実験から裏付けられた。当初の予定と異なりHAとデスモプラキンの結合は皮膚などの局所ではなく主に血中で起こっている事が示され、当研究の波及効果の高さが示唆された。しかしながら、血中小分子HAは *in vitro* の実験からは炎症促進作用が示されているものの、そのレベルを生体内で1

週間にわたり2倍程度まで高めただけでは、肝臓や腎臓、脾臓の遺伝子発現プロファイルには影響が認められず、したがって血中小分子HA自体がそもそも生体内でどのような働きをしているのかが不明なままで、現状血中小分子HAにデスモプラキンが結合する事の意義を問えずにいる。しかしながらその解明に向けて既にHAS2トランスジェニックマウスを作出しており、今後このマウスを用いてまずは長期の血中小分子HAレベルの上昇がもたらす影響を解明し、次いでその影響がHAとデスモプラキンの結合によってどのように調節されるかを明らかにしていく予定である。

## (引用文献)

- 1) Lesley *et al.* TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J Biol Chem* 279, 25745-54 (2004)
- 2) Schiller *et al.* Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Mol Syst Biol* 11, 819 (2015)
- 3) Skandalis *et al.* Intracellular hyaluronan: Importance for cellular functions. *Semin Cancer Biol* 62, 20-30 (2020)
- 4) Yau *et al.* Serological Epithelial Component Proteins Identify Intestinal Complications in Crohn's Disease. *Mol Cell Proteomics* 16 (7), 1244-57 (2017)