

機関リポジトリ登録用論文の要約

論文提出者氏名	成育科学領域小児病態学教育研究分野 氏名 唐沢 貴生
<p>(論文題目) Glomerular endothelial expression of type I IFN-stimulated gene, DExD/H-Box Helicase 60 via Toll-like receptor 3 signaling: Possible involvement in the pathogenesis of lupus nephritis (糸球体内皮細胞における I 型インターフェロン誘導遺伝子 DExD/H-Box Helicase 60 の発現：ループス腎炎の病態への関与の可能性)</p>	
<p>(内容の要約)</p> <p>【緒言】全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus: SLE) やループス腎炎 (lupus nephritis: LN) の発症において I 型 interferon (IFN)の持続的活性化が重要な役割を果たしており、一部に Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) シグナルを介した自然免疫系の活性化が関与すると考えられている。小児期に発症した SLE 患者の末梢血単球では、I 型 IFN によって誘導される遺伝子である DDX60 の発現が増加していると報告されている。また、ヒト樹状細胞において、ウイルス感染は DDX60 の発現を亢進させることも報告されている。しかし、腎糸球体血管内皮細胞 (glomerular endothelial cells: GECs)における DDX60 の発現とその役割は、まだほとんど知られていない。そこで本研究では、ヒト培養 GECs を用いて DDX60 の発現を検討した。</p> <p>また、LN の病態に重要と考えられているアポトーシスと DDX60 の発現の関係も検討した。</p> <p>【方法】GECs は、ScienCell 社から購入し培養した。TLR3、TLR7、TLR8 の各アゴニストである polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC)、R848、CpG をそれぞれ GECs に添加し、DDX60 の mRNA の発現について quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) を用いて検討した。poly IC 処理による GECs では IFN-β の mRNA の発現についても同様に検討し、リコンビナント IFN-β 処理による DDX60 の mRNA の発現も検討した。DDX60、caspase 9、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) のタンパク質の発現については western blotting を用いて検討した。また、small interfering RNA (siRNA) を用いて RNA 干渉法による DDX60 と IFN-β のノックダウンを行い、シグナル伝達経路を検討した。さらに、DDX60 の疾患による発現の違いや LN における DDX60 の発現の局在を調べるため、びまん性 LN (class IV)、メサングウム増殖性 LN (class II)、IgA 腎症、nutcracker syndrome の患者の生検標本を用いて DDX60 の immunofluorescence staining を行った。</p> <p>【結果・考察】poly IC 処理による GECs において DDX60 の mRNA とタンパク質は濃度依存性・時間依存性に発現が増加したが、R848、CpG 処理では DDX60 の mRNA は発現が増加せず、DDX60 の発現は主に TLR 3 シグナルによって制御されることが示唆された。IFN-β の mRNA は poly IC 処理から 2 h 後で最大値となり以降は減少したが、</p>	

DDX60 の mRNA は 4-8 h 後に最大値となり以降は 24 h 後まで平坦となった。IFN- β をノックダウンすると poly IC により誘導される DDX60 の発現が抑制され、リコンビナント IFN- β 処理により DDX60 の mRNA とタンパク質の発現が誘導された。これらの結果から、GEC における TLR3/IFN- β /DDX60 axis の存在が示唆された。また、DDX60 をノックダウンすると poly IC により誘導される IFN- β の発現が抑制された。このことから、DDX60 は TLR3 の活性化により IFN- β を介して誘導されるだけでなく、IFN- β へのポジティブフィードバックの経路もあると考えられた。

DDX60 とアポトーシスの関連を調べるために、DDX60 の siRNA を導入した GECs を poly IC で処理し、アポトーシスのマーカーである caspase 9 と PARP のタンパク質を western blotting で調べた。その結果、DDX60 をノックダウンし、poly IC を添加した GECs において caspase 9 の切断型と PARP の切断型が増加し、アポトーシスが亢進したと考えられた。このことから、DDX60 は過剰なアポトーシスを抑制している可能性が考えられた。

DDX60 の immunofluorescence staining では、びまん性 LN の生検標本で強く発現が見られたが、メサングウム増殖性 LN では軽度であり、IgA 血管炎と nutcracker syndrome では極わずかであった。そこで、びまん性 LN の生検標本を、DDX60 と GEC のマーカーである CD34 による二重染色を行った結果、DDX60 は主に GEC 領域に発現していることがわかった。

【結論】GECs において、poly IC による TLR3 活性化は IFN- β や DDX60 の発現を誘導し、また、びまん性 LN 患者の生検標本で DDX60 が GECs に強く発現していることが明らかとなった。DDX60 はウイルス感染による炎症反応に寄与する分子として LN の病態に関連していると考えられた。また、DDX60 をノックダウンするとアポトーシスが誘導されることから、DDX60 は過剰なアポトーシスを防ぐことで LN の悪化を防いでいる可能性も示唆された。