

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	感覚統合科学領域耳鼻咽喉・頭頸部外科学教育研究分野 氏名 佐藤 雅未
<p>(論文題目)</p> <p>『Diamidobenzimidazole, an agonist of STING, induces the expression of retinoic acid-inducible gene-I and interferon-induced transmembrane protein 1 in BEAS-2B cells』</p> <p>(STING アゴニストであるジアミドベンズイミダゾールは BEAS-2B 細胞においてレチノイン酸誘導性遺伝子 I およびインターフェロン誘導性膜貫通タンパク質 1 の発現を誘導する)</p>	
<p>呼吸器系はウイルスなどの外来微生物と恒常的に接触しており、気管支上皮細胞はウイルス感染に対する生体防御の第一線として機能する。近年は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-COV2) のパンデミックが世界的な問題となり、気道上皮における自然免疫応答の重要性が再認識された。自然免疫は、速やかに誘導される非クローン性の免疫応答を特徴とし、パターン認識受容体 (pattern recognition receptors : PRRs) でウイルス核酸を感知し、一連のシグナル伝達を介して炎症性サイトカインや I 型 IFN (Interferon) の産生が誘導される。STING (stimulator of interferon genes) は、小胞体に局在する自然免疫応答分子の一つである。PRRs の 1 つである cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase) がウイルス由来の 2 本鎖 DNA を認識することによって環状 GMP-AMP (cyclic GMP-AMP : cGAMP) が合成される。cGAMP がセカンドメッセンジャーとして STING に結合することによって、小胞体からゴルジ体へ移動し STING が活性化される。その後、I 型 IFN の発現が誘導され、様々な IFN 誘導遺伝子 (interferon stimulated genes: ISGs) の転写誘導が促進され、自然免疫応答が生じる。RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) はウイルス由来の 2 本鎖 RNA を検知する PRR であり、インフルエンザウイルスなど呼吸器感染症の原因ウイルスの感知に重要な分子である。また、IFITM1 (IFN-induced transmembrane protein 1) は IFN 誘導性の膜貫通タンパク質でウイルスの細胞内侵入を防ぐことが知られている。RIG-I と IFITM1 は、ともにウイルスに対する自然免疫応答を担う重要な ISGs コード分子であるが、STING との関連については十分に検討されていない。そこで、申請者は、ヒト気管支上皮細胞モデルである BEAS-2B 細胞を用いて、STING アゴニストである diamidobenzimidazole (diABZI) が RIG-I および IFITM1 の発現レベルに及ぼす影響を検討した。細胞は、</p>	

10%ウシ胎児血清（FBS）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）に抗生物質ペニシリン/ストレプトマイシンを加えて培養した。mRNA の発現は RTqPCR 法、細胞内タンパク質の発現はウェスタンブロット法、培養上清中の IFN- $\beta$  は ELISA 法で解析した。ノックダウン試験は RNA 干渉法を用いた。結果 1: diABZI 処理した BEAS-2B 細胞において、RIG-I および IFITM1 の mRNA およびタンパク質の発現レベルは濃度および時間依存的に上昇した。結果 2: diABZI 処理した BEAS-2B 細胞において、RIG-I および IFITM1 の mRNA およびタンパク質の発現は、STING siRNA のトランスフェクションによって部分的に抑制された。また、diABZI 処理した BEAS-2B 細胞において、IFN- $\beta$  の mRNA およびタンパク質の発現は未処理時と比較して増加したが、STING siRNA 処理によって抑制された。さらに、リン酸化 STAT1 (P-STAT1) タンパク質の発現は、diABZI 処理により上昇し、STING siRNA により抑制された。結果 3: diABZI 処理した BEAS-2B 細胞において、RIG-I および IFITM1 の mRNA およびタンパク質発現は IFN- $\beta$  siRNA のトランスフェクションによって抑制された。diABZI 処理で IFN- $\beta$  のタンパク質発現は上昇したが、IFN- $\beta$  si 処理により IFN- $\beta$  タンパク質の発現は有意に減少させた。組換えヒト IFN- $\beta$  (r(h)IFN- $\beta$ ) で処理した BEAS-2B 細胞では、RIG-I および IFITM1 の mRNA およびタンパク質発現が増加した。これらの結果は、気道上皮細胞において STING/IFN- $\beta$  系の活性化が RIG-I と IFITM1 の発現レベルをアップレギュレートし、RNA ウイルス認識経路の活性化および細胞内へのウイルス侵入の阻害を引き起こしていることを示している。この知見は、STING の活性化が呼吸器ウイルス感染に対する防御において重要な反応であり、その効果の少なくとも一部には、RIG-I に関連した抗ウイルス防御の活性化と IFITM1 に関連したウイルス侵入の抑制を介していることを示している。diABZI による STING - IFN- $\beta$  - RIG-I/IFITM1 の活性化経路は、ウイルスによって引き起こされる上気道感染症における新たな治療標的となる可能性がある。