

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域 腎臓病態内科学教育研究分野 氏名 奈川 大輝
<p>(論文題目)</p> <p>Hypoxia-inducible factor-1<math>\alpha</math> suppresses the innate immune response in cultured human proximal tubular cells (低酸素誘導因子-1<math>\alpha</math> は培養ヒト近位尿細管細胞の自然免疫応答を抑制する)</p>	
<p><b>【背景】</b></p> <p>自然免疫受容体の一つ Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I like receptors (RLRs) には RIG-I や Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) があり, これらは dsDNA を認識する受容体として, ウイルス感染に対する自然免疫応答を担っている. BK ウイルスなどのウイルス腎症において腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs) に RLRs が発現することから, RPTECs には RLRs を介した自然免疫応答の存在が示唆される.</p> <p>自然免疫応答に影響を与える因子の一つとして, Hypoxia-inducible factor (HIF)がある. HIF は生体が低酸素環境に適応するために発現する遺伝子であり, RPTECs には HIF のアイソフォームの一つである HIF 1<math>\alpha</math> が発現する. しかし, RPTECs の自然免疫応答における HIF 1<math>\alpha</math> の役割については明らかではない. 本研究では, RPTECs の自然免疫応答における低酸素環境および HIF1<math>\alpha</math> の役割について検討した.</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>培養した初代ヒト RPTECs に, ウイルス感染を模倣するために合成二本鎖 RNA アナログ(polyIC) で刺激した. 正常酸素環境, 低酸素環境ならびに低酸素環境模倣剤として HIF を安定化させる作用のある塩化コバルトを添加した正常酸素環境の 3 条件を設定し, RPTECs を暴露した. 自然免疫応答への影響について, qRT-PCR, Western blotting を用い, RLRs として RIG-I, MDA5, 炎症性サイトカインとして Interferon-beta (IFN<math>\beta</math>), Interleukin (IL) 6, Tumor necrosis factor-alpha (TNF<math>\alpha</math>) の発現を各々評価した. 細胞障害性については LDH 活性で評価した. HIF1<math>\alpha</math> の役割を検討するため, 低分子干渉 RNA (siRNA) によって HIF1<math>\alpha</math> をノックダウンした.</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>24 時間の polyIC 刺激によって RIG-I と MDA5 の mRNA 発現レベルはコントロールに比べ, それぞれ 9.4<math>\pm</math>0.4 倍, 10.8<math>\pm</math>0.5 倍増加したが, 低酸素環境での polyIC 刺激では 5.4<math>\pm</math>0.1 倍, 7.4<math>\pm</math>0.1 倍と, 正常酸素環境に比べ, その増加の割合が有意に減少した (p&lt;0.001). RIG-I, MDA5 の蛋白発現レベルは mRNA 発現レベルと同様の傾向を示した. IFN<math>\beta</math>, IL6, TNF<math>\alpha</math> の mRNA 発現レベルは, 6 時間の polyIC 刺激によってコントロールに比べ, それぞれ 4.0<math>\pm</math>0.1 倍, 7.3<math>\pm</math>0.5 倍, 3.9<math>\pm</math>0.3 倍増加したが, 低酸素環境での polyIC 刺激では 2.4<math>\pm</math>0.3 倍, 4.2<math>\pm</math>0.7 倍, 2.1<math>\pm</math>0.4 倍と, 正常酸素環境に比べ, その増加の割合が有意に減少した (p&lt;0.05). 塩化コバルトを添加した環境下でも同様の結果であった.</p> <p>siRNA を用いて HIF1<math>\alpha</math> をノックダウンし低酸素環境で polyIC 刺激をすると, RIG-I, MDA5, IFN<math>\beta</math>, IL6, TNF<math>\alpha</math> の mRNA 発現レベルは, それぞれ有意に増加した. 低酸素環境で発現する HIF1<math>\alpha</math> は, polyIC 刺激による RLRs, 炎症性サイトカインの発現を抑制することが示された.</p> <p>各条件での LDH 活性から細胞障害性を評価した. HIF1<math>\alpha</math> のノックダウンは polyIC 刺激もしくは低酸素環境での細胞傷害性を増加させ, 低酸素環境で polyIC 刺激をした場合</p>	

は細胞傷害性がさらに増強した。

**【考察】**

本研究では、RPTECsの polyIC に対する RLRs を介した自然免疫応答における低酸素環境および HIF1 $\alpha$  の役割を検討した。低酸素環境が polyIC 刺激時に RPTECs の RLRs と炎症性サイトカインの発現を抑制し、低酸素環境への曝露が RPTECs の炎症反応を軽減させる可能性が示された。塩化コバルトと siRNA を用いた実験により、RPTECs に対する低酸素環境の影響は主として HIF1 $\alpha$  を介することが示された。

細胞障害性について、本来 HIF1 $\alpha$  が発現する環境下で HIF1 $\alpha$  をノックダウンすることで細胞障害性が増加する結果であった。このことから、本来発現していた HIF1 $\alpha$  は細胞死を防ぐ保護的な効果があると考えられた。

慢性腎臓病では、酸化ストレスや尿毒症物質により、低酸素環境で本来発現する必要量の HIF1 $\alpha$  活性化が生じないことが知られている。本研究の結果から、慢性腎臓病における相対的な HIF1 $\alpha$  発現の不足は、ウイルス腎症を罹患した場合での細胞の炎症を促進し、細胞障害を増強させ細胞死に至る可能性が示唆された。

**【結論】**

培養した RPTECs において、低酸素環境が polyIC 刺激に対する RIG-I, MDA5 の発現を抑制し、炎症性サイトカインの発現を低下させた。低酸素環境においては、HIF1 $\alpha$  活性を介した自然免疫応答の抑制が示唆された。