

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 腎臓病態内科学分野 氏名 中田真道
<p>(論文題目)</p> <p>PolyIC induces retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5 and modulates inflammation in podocytes.</p> <p>(PolyIC はヒトポドサイトにおいて細胞質内パターン認識受容体の発現を誘導し炎症反応を惹起する)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>背景：ウイルス感染は、しばしばネフローゼ症候群の発症や悪化の契機となるが、その原因として腎固有細胞における免疫応答の関与が示唆されている。宿主防御の第一線である自然免疫では、病原体特有の表面分子を認識するパターン認識受容体が重要な役割を果たす。それらのうち、Toll-like receptors (TLRs)が主に細胞膜上に存在するのに対し、Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like Receptors (RLRs)は、細胞質に存在する。近年、腎における TLRs の発現やその役割についての解明が進んでいるが、RLRs については、依然として明らかではない。</p> <p>人工の二重鎖 RNA である Polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC)は、ウイルス感染を模倣するリガンドである。メサンギウム細胞、糸球体内皮細胞などの腎固有細胞において、polyIC により、RLRs に属する Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) と Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) が誘導されることが報告されているが、ポドサイトにおいては不明である。ポドサイトは、糸球体ろ過の最終障壁となる上皮細胞であり、その障害は尿蛋白の原因として重要である。本研究では、ポドサイトに polyIC を添加し、RIG-I ならびに MDA5 の発現や炎症反応の惹起について解析し、RLRs のポドサイト障害への関与について検討した。</p> <p>方法：ヒト不死化ポドサイトを 33 度で増殖させ、その後 37 度で 10 日間培養し分化を誘導した。1%低血清培地で 24 時間培養後、polyIC (2 ng/ml-500 µg/ml)を加えた培地で 1.5~30 時間培養し、RIG-I と MDA5 の mRNA 発現を定量 RT-PCR で、タンパク発現を Western blot でそれぞれ評価した。また、炎症性サイトカインである Interferon-β (IFN-β) と Interleukin-6 (IL-6)の mRNA 発現を定量 RT-PCR で測定した。さらに、small interfering RNA (siRNA)のトランスフェクションにより RIG-I と MDA5 をノックダウンし、それらの役割について検討した。加えて、アクチン線維を染色する Phalloidin を用い、ポドサイト障害において観察されるアクチン再構成を評価した。統計的有意性は Student の t 検定あるいは ANOVA を用いて評価した。P 値<0.05 を統計学的に有意とし、統計ソフトウェアは JMP(version 14.0)を用いた。</p> <p>結果：ポドサイトへの polyIC の添加により、RIG-I と MDA5 の mRNA ならびに蛋白の発現は、時間依存的かつ濃度依存的に増加した(n=3, p<0.01)。IFN-β ならびに IL-6 の mRNA 発現も polyIC により増加した(n=3, p<0.01)。ポドサイトにおいて RIG-I または MDA5 をノックダウンした後、同様に polyIC で刺激したところ、いずれの場合も IFN-β の発現は減弱した(n=3, p<0.05)。一方で、IL-6 の発現の減弱は MDA5 のノックダウンでのみ観察され(n=3, p<0.01)、RIG-I のノックダウンでは認められなかった。また、polyIC 刺激により、ポドサイトのアクチン再構成が引き起こされたが、RIG-I あるいは MDA5 のノックダウンで一部軽減した。</p> <p>考察：ウイルス感染による腎臓病の発症機序として、抗ウイルス抗体を含む免疫複合体の糸球体毛細血管への沈着による糸球体腎炎のほか、ウイルスによる直接的な影響が示唆されている。特にステロイド反応性ネフローゼ症候群においては、急性上気道炎などのウイルス感染は少なくとも再発の半数を占め、免疫学的機序の果たす役割は大きいことが知られている。しかし、根本的な病因は未だに不明である。</p> <p>ポドサイトにおける感染の直接作用については、これまでに Lipopolysaccharide (LPS)による TLR4 を介した作用、polyIC による TLR3 を介した作用などが報告され、実際にポドサイト障害を生じること、動物実験レベルで尿蛋白を惹起することが示されている。本研究では、パターン認識</p>	

受容体の中で、これまでにほとんど明らかにされていない RLRs の RIG-I、MDA5 について、それらの発現や、炎症反応の誘導、ポドサイト障害への関与について検討した。その結果、ポドサイトにおいて polyIC により RIG-I、MDA5 の発現が劇的に増加することが示された。さらに、通常自然免疫応答として誘導される IFN- β や IL-6 の発現が増加し、実際にポドサイト障害が観察された。これらの作用が、siRNA により RIG-I ならびに MDA5 をノックダウンすることにより軽減されたことから、ポドサイトにおけるウイルス応答として、RIG-I ならびに MDA5 が一定の役割を担うことが明らかとなった。RIG-I と MDA5 の役割については若干の相違がみられ、RIG-I または MDA5 のノックダウンにより、いずれの場合も IFN- β の発現は減弱したのに対し、IL-6 の発現は MDA5 のノックダウンでのみ減弱した。これは、以前メサンギウム細胞を用いて行われた先行研究と一致する結果であった。

アクチン骨格はポドサイトの正常な機能維持に必要不可欠である。ストレス下において、アクチン再構成が生じると、組織学的には足突起癒合として観察され、臨床的には蛋白尿を呈すると考えられている。本研究では、polyIC により RIG-I と MDA5 の発現が増加したのみならず、アクチン再構成への関与も明らかとなり、臨床的にも意味のある役割を担うことが示唆された。

結論：培養ヒトポドサイトにおいて、polyIC は細胞質内パターン認識受容体 RLRs である RIG-I と MDA5 の発現を劇的に増加させた。さらに、IFN- β と IL-6 の発現とともにアクチン再構成が認められた。これらの作用は RIG-I と MDA5 のノックダウンによって一部減弱し、ウイルス感染によるポドサイトへの直接作用において RIG-I と MDA5 は一定の役割を担うことが示唆された。