

学位請求論文の内容の要旨

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 佐藤 理子
<p>(論文題目) Inhibitory effect of anti-malarial agents on the expression of proinflammatory chemokines via Toll-like receptor 3 signaling in human glomerular endothelial cells (ヒト腎糸球体内皮細胞における Toll 様受容体 3 シグナルを介した抗マラリア薬の炎症性ケモカインの発現抑制効果)</p>	
<p>(内容の要旨：和文で 2,000 字程度)</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) の病態は未だ不明な点が多いが、一部に Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) が関与すると考えられている。SLE や LN の治療として、免疫抑制剤やステロイド系抗炎症薬の他、抗マラリア薬である chloroquine (CQ) や hydroxychloroquine (HCQ) が用いられているが、その詳細な機序は未だに不明である。CQ や HCQ は、SLE/LN に有益な効果をもたらすが、いくつかの副作用も引き起こす。中でも、網膜症は頻度が低いものの有名な副作用である。HCQ は CQ と比べて網膜症の頻度が低いとされている。</p> <p>TLR3 は外因性リガンドであるウイルス 2 本鎖 RNA だけでなく、内因性リガンドである自己核酸分子によっても活性化され、1 型 interferon (IFN) や様々な炎症性ケモカインを産生するため、自己免疫性疾患との関連が指摘されている。SLE や LN は 1 型 IFN の持続的な活性化が原因の一つとされることから、これまでに TLR3 と SLE/LN の関連性について様々な報告がされてきた。単球・リンパ球の走化性因子である Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)、単球・好酸球などの走化性因子である C-C motif ligand 5 (CCL5) は、LN の腎組織で強く発現していること、尿中のこれらのケモカインレベルが LN の重症度と相関することから、LN の病態形成に重要な役割を果たす炎症性ケモカインであると考えられている。今回、ヒト培養腎糸球体内皮細胞 (glomerular endothelial cells: GECs) を用いて、抗マラリア薬による TLR3 シグナルを介した炎症性ケモカインの発現変化について検討した。</p> <p>【方法】GECs は、ScienCell 社から購入し培養した。TLR3 のアゴニストであり、合成 2 本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (poly IC) を GECs に添加し、MCP-1 及び CCL5 の mRNA とタンパク質の発現について quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)、Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA) 法を用いて検討した。また、small interfering RNA (siRNA) を用いて RNA 干渉法によるノックダウンを行い、シグナル伝達経路の詳細を検討した。さらに、CQ、HCQ、ステロイド系抗炎症薬である dexamethasone (DEX) で前処理した GECs に poly IC を添加し、qRT-PCR と ELISA を用いて MCP-1、CCL5、IFN-β の発現変化について検討した。また、Signal Transduction and Activator of Transcription (STAT) -1 のリン酸化に及ぼす影響を western blotting を用いて検討した。</p> <p>【結果・考察】poly IC 処理により、GECs における MCP-1 と CCL5 の mRNA とタンパク質はいずれも時間及び濃度依存性に発現した。Nuclear factor (NF) -κB p65、IFN-β をノックダウンしたところ、poly IC によって誘導される MCP-1 と CCL5 のい</p>	

れも発現が抑制された。このため、MCP-1、CCL5 はいずれも TLR3 の活性化により NF- κ B、IFN- β を介して誘導されることが明らかとなった。

GECs を DEX で前処理したところ、poly IC による MCP-1 と CCL5 の発現は変化させず、TLR3/IFN- β /MCP-1、TLR3/IFN- β /CCL5 のシグナル伝達経路は抑制しないと考えられた。GECs を CQ で前処理したところ、poly IC による MCP-1 と CCL5 両方の発現が抑制された。一方、HCQ の前処理によって、poly IC による CCL5 の発現は抑制されるものの、MCP-1 と IFN- β の発現は抑制されず、STAT-1 のリン酸化も抑制されなかった。このことから、CQ と HCQ は TLR3 シグナル伝達経路を抑制するが、その作用点に相違があることが明らかとなった。

【結論】 GECs において、poly IC による TLR3 活性化は IFN- β や MCP-1、CCL5 の発現を誘導することが明らかとなった。抗マラリア薬である CQ、HCQ は TLR3 シグナル伝達経路に作用し、GECs における炎症性ケモカインの発現を抑制することが明らかとなった。CQ はこの伝達経路において IFN- β よりも上流に作用し MCP-1 と CCL5 の両方の発現を抑制する一方、HCQ は IFN- β よりも下流に作用し CCL5 のみを抑制する。このような作用点の相違は、HCQ が CQ よりも網膜症などの副作用の発現頻度が低いことと関連する可能性があるが、これを確かめるためにはさらなる検討が必要である。