

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 呼吸病態内科学教育研究分野 氏名 土橋 雅樹
<p>(論文題目)</p> <p>Toll-like receptor 3 signaling induces interferon-induced transmembrane protein 1 in BEAS-2B cells</p> <p>(BEAS-2B 細胞において Toll-like receptor 3 のシグナルは interferon-induced transmembrane protein 1 を誘導する)</p>	
<p>(内容の要約)</p> <p><背景></p> <p>Toll-like receptor 3 (TLR3)は TLR ファミリーの一つで、ウイルスの二本鎖 RNA(double-stranded RNA: dsRNA)を認識する受容体であり、ウイルスに対する免疫応答において重要である。dsRNA が TLR3 に結合すると interferon(IFN) type 1 が発現し、IFN-stimulated genes(ISGs)などのサイトカインが誘導され、宿主の免疫に寄与する。ヒト気道上皮細胞においても、TLR3 や、type 1 IFN である IFN-β が抗ウイルス反応に関わっていることはよく知られている。</p> <p>ISGs ファミリーのタンパク質である IFN-induced transmembrane proteins (IFITMs)は細胞膜の表面に発現しており、HCV や A 型インフルエンザウイルス、デングウイルス West Nile ウイルス、HIV の感染を阻害することが報告されている。IFITM1 は IFITM 蛋白の一つであり、ウイルスが細胞膜に侵入するのを阻害することで、種々のウイルスの感染を防ぐことが示されている。ISG56 は ISG ファミリーの一つであり、抗ウイルス反応において種々の役割を担っており、ヒト気道上皮細胞においてウイルス感染で誘導されることが知られている。</p> <p>BEAS-2B 細胞はヒト気道上皮細胞のモデルであり、TLR3 のリガンドである polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C)により誘導される。しかし、ヒト気道上皮細胞において、TLR3、IFN-β および ISG56 と IFITM1 の発現の関係についてはよく知られていない。</p> <p><目的></p> <p>BEAS-2B ヒト気道上皮細胞において、poly I:C 処理による ISG56 および IFITM1 の発現を調べた。</p> <p><方法></p> <p>細胞の培養：</p> <p>BEAS-2B 細胞を、10%FBS を添加した DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)で培養した。初めの実験では 0、10、30、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の poly I:C を添加し、2 つ目の実験では 30$\mu\text{g}/\text{mL}$ の poly I:C を添加し、最大 24 時間まで処理を行った。また、1ng/mL の IFN-β の 16 時間添加も行った。</p> <p>IFN-β、ISG56 に対する RNA 干渉を行い、48 時間のインキュベート後に 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の poly I:C が添加され、上記と同様にインキュベートされた。</p>	

リアルタイム polymerase chain reaction(PCR) :

illustaRNA spin kitを用いて BEAS-2B から RNA を抽出し、single-stranded cDNA を作成した。IFITM1、ISG56、およびコントロールとして GAPDH に対応する primer を用いて測定を行った。

Western blot analysis :

IFITM1、ISG56、アクチンのタンパク質の発現を Western blot で調べた。Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、Laemmli の緩衝剤で溶解し、5~20% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、タンパク質を Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。IFITM1 (1:2000)、ISG56 (1:3000)、アクチン (1:3000) に対する抗体の horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG で標識し、化学発光にて検出した。

< 結果 >

- ① BEAS-2B 細胞において、poly I:C は時間・濃度依存性に IFITM1 の発現を誘導していた。
- ② BEAS-2B 細胞において、IFN- β は IFITM1 の発現を誘導した。
- ③ IFN- β 、ISG56 の knockdown は、poly I:C による IFITM1 の発現を抑制した。

< 結論 >

BEAS-2B 細胞において、IFITM1 は poly I:C により時間・濃度依存性に誘導されること、およびその発現は IFN- β および ISG56 のノックダウンにより抑制されることが示された。IFITM1 はヒト気道上皮細胞の TLR3 がウイルス二本鎖 RNA を認識すると IFN- β 、ISG56 を介して発現し、抗ウイルス免疫反応に寄与していると考えられる。また、IFITM1 は SARS-CoV-2 と感染細胞の融合を阻害すると示す既報があり、ヒト気道上皮細胞においても IFITM1 は SARS-CoV-2 への感染防御に寄与している可能性が考えられる。

本研究では poly I:C による ISG56 および IFITM1 の発現を確認したが、ウイルスに感染した細胞における発現については明らかにはできなかったため、更なる研究が必要である。