

## 審査結果の要旨

氏名 池田 四葉

本研究は、様々な腎疾患の誘因・増悪因子となる酸化ストレスおよび小胞体ストレスによって共に惹起されるシグナル伝達系に、近年、多くの生理学的・病理学的反応の制御に重要な役割を果たしていることが報告されている micro RNA (miR) による転写後制御が関与しているという仮説のもと、その mR の同定および機能解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 培養ヒト尿細管細胞 (HK-2) を用いて、低酸素-再酸素化 (0.1% O<sub>2</sub> の低酸素環境下で 16 時間培養の後、3 時間もしくは 10 時間の再酸素化) を行う酸化ストレス群、および tunicamycin (2 μg/ml, 24 時間) もしくは thapsigargin (0.5 μg/ml, 24 時間) の前処置を行う小胞体ストレス群で miR microarray 解析を行った。その結果、解析に用いた 799 種のうち、酸化ストレス群および小胞体ストレス群に共通して有意な変動を示す唯一の miR として miR-205 を同定した。
2. miR-205 の発現は、酸化ストレスもしくは小胞体ストレスに曝露された尿細管細胞とともに有意に抑制されており、siRNA を用いて miR-205 の発現を抑制した HK-2 を用いて Trypan blue exclusion assay や FACS 解析を行なった結果、miR-205 発現抑制 HK-2 は細胞増殖が抑制されており、また酸化ストレスおよび小胞体ストレスに対する感受性が亢進し、細胞生存率の低下、細胞内 ROS の増加がみられた。
3. miR-205 の発現を抑制した HK-2 細胞において、細胞内 ROS の制御に関わる各種抗酸化酵素の発現量を real time RT-qPCR にて解析したところ、copper/zinc superoxide dismutase (SOD1), manganese superoxide dismutase (SOD2), catalase, hemoxygenase 1 (HO-1) の発現が有意に低下しており、細胞内 ROS 増加の原因と考えられた。
4. 酸化ストレスおよび小胞体ストレスのシグナル伝達関連を中心に miR-205 の標的を検索した結果、miR-205 の発現抑制により hypoxia-inducible factor (HIF) の制御分子 prolyl hydroxylase domain 1 (PHD1) の発現が有意に亢進することを確認した。この PHD1 の発現は、低酸素-再酸素化を行なった HK-2 細胞、および tunicamycin で小胞体ストレスを誘導した HK-2 細胞でも有意に増加していることを確認した。
5. PHD1 の 3' UTR の配列を解析した結果、miR の結合に特に重要であるとされている seed sequence を含め miR-205 と相補性の高い配列領域を 1 ヶ所同定した。この領域を含む PHD1-3'UTR を SV40 promoter の下流にホタルルシフェラーゼとともに連結した vector を用いて、reporter assay を行なった結果、miR-205 の発現抑制による PHD1 転写活性の亢進を確認し、PHD1 が miR-205 によって直接制御される標的遺伝子の一つである可能性が示唆された。

以上、本研究は、酸化ストレスおよび小胞体ストレスによって障害を受けた尿細管細胞において、双方に関連するシグナル伝達系に **miR-205** が関与していることを明らかにした。**miR-205** は下流の **PHD1** および抗酸化酵素の発現調節を介して酸化ストレス及び小胞体ストレスに対する細胞の抵抗性を誘導している可能性が示唆される。本研究は腎尿細管細胞において、様々な腎疾患の誘因・増悪因子である酸化ストレスおよび小胞体ストレスの制御に関わる **miR** を初めて同定し、将来的にはこれが多くの腎障害の進行抑制につながる包括的な治療戦略の新たな治療ターゲットとなる可能性を提示しており、学位の授与に値するものと考えられる。