

審査の結果の要旨

氏名 山口 純奈

本研究は生体内の多くの病態において重要な役割を果たしている低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor, HIF) の発現制御ネットワークを解明するため、RNA interference (RNAi) スクリーニングにより HIF-1 $\alpha$  の上流遺伝子である CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$  (CEBPD) を同定し、腎臓でのその役割について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HIF-1制御遺伝子の*in vivo*でのスクリーニングとして、ラット腎動脈狭窄 (renal artery stenosis, RAS) モデル (day3, day7) 腎皮質のマイクロアレイ解析の結果を用い、sham腎と比較しRASモデルで継続的に発現上昇した150遺伝子を抽出した。これらの遺伝子に対するshRNA発現プラスミドを作成し、*in vitro*でのスクリーニングとして、HIF-1の発現調節能をshRNAとヒト子宮頸癌由来であるHeLa細胞を用いて分子生物学的に検索した。HIF-1 $\alpha$ 蛋白量、hypoxia response element (HRE) レポーターアッセイ、HIF-1標的遺伝子の発現量変化から、CEBPDを新規HIF-1制御遺伝子として同定した。
2. *In vivo*で低酸素によりCEBPDが発現誘導されることをマウス及びラットの低酸素モデルを用いて検証した。マウスの全身低酸素モデルを作成し、低酸素下の腎臓でCEBPDが発現することを示した。さらにラットでも急性及び慢性虚血性腎疾患モデルを作成しCEBPDの発現解析を行った。急性虚血性腎疾患モデルとして用いた虚血再灌流障害とシスプラチン腎症、慢性虚血性腎疾患モデルとして用いたRASと5/6腎摘モデルの4疾患いずれにおいても腎皮質でのCEBPDのmRNA発現上昇を認め、免疫組織染色によりCEBPDがHIF-1 $\alpha$ と同じ尿細管細胞に発現していることを示した。
3. ヒト近位尿細管の cell line である HK-2 細胞においても低酸素により CEBPD が発現亢進することを mRNA レベルと蛋白レベルで確認した。この発現は HIF-1 非依存的であること HIF-1 $\alpha$  に対する siRNA を用いた実験により示した。その上で、HK-2 細胞においても CEBPD が HIF-1 $\alpha$  発現制御能を有することを CEBPD に対する siRNA を用いた実験を行い証明した。
4. CEBPD/HIF-1 経路が通常酸素下でも活性化される可能性について、急性・慢性腎疾患いずれにおいても存在し、低酸素と相互作用する炎症に着目して解析を行った。上述の四疾患において、腎疾患での代表的な炎症細胞であるマクロファージの浸潤とともに、炎症性サイトカインの上昇を認めた。マクロファージから産生される代表的なサイトカインであるインターロイキン-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) により CEBPD の発現誘導並びに CEBPD 依存性の HIF-1 $\alpha$  発現誘導が HK-2 細胞においてみられた。

5. 低酸素及びIL-1 $\beta$ 刺激下でのHIF-1 $\alpha$  mRNA量はCEBPDに依存して増加した。HIF-1 $\alpha$  プロモーターアッセイではCEBPDによる明らかなHIF-1 $\alpha$ プロモーターへの結合は認めなかった。HIF-1 $\alpha$  RNAの安定性は低酸素とIL-1 $\beta$ いずれの刺激によっても増強し、CEBPDはHIF-1 $\alpha$ のRNA安定性を向上させることでその蛋白発現量を制御していると結論づけられた。
6. 低酸素あるいはIL-1 $\beta$ 刺激前に nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 阻害剤を添加したところ、両刺激による CEBPD 及び HIF-1 $\alpha$  の発現誘導が抑制された。さらに、レトロウイルスを用いて HK-2 細胞で作成した CEBPD 安定的発現細胞株に同刺激を行ったところ、NF- $\kappa$ B 阻害下でも HIF-1 $\alpha$  の発現量が回復した。

以上、本論文は RNAi スクリーニングを用いた解析から、主要な転写因子である CEBPD を新規 HIF-1 制御遺伝子として同定し、急性・慢性虚血性腎疾患における CEBPD の発現プロファイルを明らかにした。さらに、CEBPD は NF- $\kappa$ B により発現誘導され、HIF-1 $\alpha$  の RNA を安定化させることでその蛋白発現量を制御することを解明した。本研究は、HIF-1 の新たな発現制御メカニズムを明らかにし進行性腎障害における新たな治療法としての可能性も秘めた重要な発見であるとともに、これまでほとんど解明されていなかった CEBPD の腎臓での機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。