

審査の結果の要旨

氏名 三浦 理加

本研究では慢性腎臓病（CKD）の進行に関与する SNP を持つ遺伝子の一つとして同定されたクロマチンリモデリング因子 INO80 の腎臓における機能について近位尿細管細胞株（HK-2 細胞）および障害腎モデルラットを用いて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. HK-2細胞に低酸素刺激を与えると酸素濃度勾配に従いINO80の発現が mRNA レベル、タンパクレベルで低下することが示された。
2. 6分の5腎摘出ラットでは sham ラットと比較して、INO80の尿細管の核における発現が一様に低下することが免疫組織化学を用いて確認された。
3. INO80と低酸素誘導因子 HIF-1の関与について評価した。塩化コバルトを添加し HIF-1を安定化した HK-2細胞において、INO80の発現は低下しなかった。また INO80のプロモーター領域で低酸素応答性配列を含む領域をクローニングしたベクターをトランスフェクションした HK-2細胞を用いて検討した結果、低酸素下で INO80は HIF-1とは非依存的に機能することが示された。
4. INO80をノックダウンした HK-2細胞を用いた機能解析では、カスパーゼアッセイにおいてカスパーゼ活性が有意に上昇し、MTS アッセイにおいてバイアビリティーが有意に低下した。また Annexin v と 7-AAD を用いたフローサイトメトリーでも Annexin v 陽性細胞が増加するという傾向が得られたことから、INO80のノックダウンで尿細管細胞のアポトーシスが促進することが明らかとなった。
5. INO80をノックダウンした HK-2細胞を用いてアポトーシス関連遺伝子の mRNA の発現量についてリアルタイム定量 PCR で評価したところ、p53 と E2F 及びこれらの下流遺伝子である NOXA の発現が上昇した。そこで p53, E2F1, NOXA のプロモーター領域のヒストン修飾の変化について Chromatin immunoprecipitation (ChIP) を行い検討したところ、ChIP-qPCR で E2F1 と NOXA のプロモーター領域の H3K4me3 が増加することが確認された。つまり INO80の発現が低下すると、E2F1を介した NOXA 遺伝子の転写が活性化し、アポトーシスが促進することが明らかとなった。
6. RNA-seq により網羅的に遺伝子解析を行った結果、INO80の発現低下により、同様に 32の発現低下する遺伝子群と3つの発現上昇する遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群の Gene Ontology 解析で STAT3 のチロシンリン酸化に関与するものが多く含まれていることが判明したため、INO80が STAT3 のリン酸化へ及ぼす影響についてウェスタンブロットで確認したところ、INO80のノックダウンで STAT3 のリン酸化が抑制されることが明らか

となった。また INO80 のノックダウンにより、STAT3 の活性化シグナル因子である IL-6 の mRNA が発現低下することから、STAT3 を介したアポトーシス経路では IL-6 のシグナル低下による STAT3 のリン酸化の抑制が関与していることが示唆された。

以上、本論文は腎尿細管細胞において低酸素下で INO80 の発現が低下することを確認し、さらに INO80 の低下により尿細管細胞のアポトーシスが促進することを示した。またアポトーシス促進に関与する因子を明らかにした。これらの結果は INO80 の遺伝子変異に伴う機能不全が CKD の進行に寄与している可能性を示すものであり、INO80 の遺伝子発現調整の機序を明らかにすることは CKD の新たな治療標的となりうると考えられる。本研究は CKD の進行の解明および治療に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。