

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	森井 健一
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 microRNA-200c regulates KLOTHO expression in human kidney cells under oxidative stress (酸化ストレス下において microRNA-200c はヒト腎細胞での KLOTHO 発現を制御する)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	松原 昭郎	
審査委員	准教授	鎌田 英明	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>慢性腎臓病では全身性老化症状を呈し，この病態に腎尿細管で発現する KLOTHO タンパクの発現低下が関与することが指摘されている。腎疾患の進展に酸化ストレスが重要な役割を果たすことが知られているが，酸化ストレスによる KLOTHO タンパク発現低下の機序は明らかではない。近年，タンパク発現を調節する主要な機構として，microRNA による転写後のタンパク発現調節が注目されている。また，ヒト臍帯静脈内皮細胞では過酸化水素刺激により microRNA-200c (miR-200c)の発現が増加し，細胞のアポトーシス・老化に関与することが報告されている。そこで，申請者は酸化ストレスによる KLOTHO タンパクの発現低下に miR-200c と KLOTHO mRNA 3'-UTR が関与しているか検討を行った。ヒト尿細管細胞（HK-2 細胞）に対して，酸化ストレスとして過酸化水素で刺激したところ，KLOTHO mRNA はコントロールと比較して 6，12 時間で発現が増加していたのに対して，KLOTHO タンパクの発現は抑制されていた。このことから KLOTHO タンパクは mRNA 翻訳レベルで発現調整されていると考えられた。KLOTHO mRNA 3'-UTR を有する luciferase reporter assay では，過酸化水素刺激により有意に luciferase 活性が抑制された。HK-2 細胞を過酸化水素で刺激することで pri-miR-200c と miR-200c の発現は増加した。また，microRNA.org でのデータベース検索により，miR-200c は KLOTHO mRNA 3'-UTR と 2 カ所で結合する可能性が示された。miR-200c mimic を HK-2 細胞にトランスフェクトしたところ，KLOTHO タンパクは発現低下した。Luciferase reporter assay では luciferase 活性低下が認められたが，miR-200c 結合部位に変異を加えることで luciferase 活性低下は抑制された。一方，KLOTHO mRNA の発現に変化は認められなかった。免疫蛍光染色では，KLOTHO タンパクは HK-2 細胞の細胞質と核に発現が認められ，miR-200c mimic のトランスフェクションにより減少した。miR-200c inhibitor を HK-2 細胞にトランスフェクトしたところ，KLOTHO タンパク発現は保持されたが，KLOTHO mRNA は有意な変化を認めなかった。ヒト IgA 腎症患者の腎生検組織を用いて KLOTHO，酸化ストレスマーカー（8-OHdG，4-HHE）の免疫染色と miR-200c の <i>in situ</i> hybridization を行った。KLOTHO タンパクと miR-200c は遠位尿細管に発現が認められた。KLOTHO タンパクの発現は酸化ストレスマーカー，miR-200c と負の相関を示した。また，酸化ストレスマ</p>			

カーの発現は miR-200c と正の相関を示した。

以上の結果から、本論文は HK-2 細胞において、過酸化水素刺激で誘導される miR-200c が *KLOTHO* mRNA 3'-UTR を介して *KLOTHO* タンパクの発現を制御していることを明らかにした。

よって審査委員会委員全員は、本論文が森井健一に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。