

論文内容要旨

Klotho deficiency intensifies hypoxia-induced expression of IFN- α/β through upregulation of RIG-I in kidneys

(Klotho の発現低下は腎において低酸素によって誘導される RIG-I と IFN- α/β の発現を増強する)

PLoS One. 2021; 16(10): e0258856.

主指導教員：正木 崇生教授

(広島大学病院 腎臓内科学)

副指導教員：服部 登教授

(医系科学研究科 分子内科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

卜部 麻子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

背景：

慢性腎不全の主な病態は慢性炎症とそれに続く組織の線維化である。このように炎症は組織障害に先行するイベントであり、炎症がどのようにして惹起されるかを明らかにすることが、腎不全の病態解明や治療ターゲットの同定において重要である。これまでの研究で、低酸素症は慢性腎不全の進行とともに増悪し、腎障害の進展に寄与することが報告されているが、腎において低酸素症が炎症を誘発する詳細なメカニズムは明らかではない。レチノイン酸誘導性遺伝子 I (RIG-I) は、SARS-CoV2 を含む様々なウイルスが侵入した際に、ウイルスの RNA を認識し、インターフェロン (IFN) α/β を産生し、免疫系を賦活する役割を担っている。近年、脳や筋細胞において低酸素状態が RIG-I を活性化することが示されており、腎においても低酸素症が RIG-I の活性化を介して IFN- α/β 発現を亢進することが示唆される。一方、Klotho 蛋白は腎尿細管で主に発現しており、腎不全の進行とともに発現は低下する。これまでの研究で、Klotho 蛋白の発現低下は、RIG-I の活性化に関与していると報告されているが、腎において低酸素症で誘導される RIG-I が、Klotho が低下した状態での IFN- α/β 発現に対する影響は明らかではない。今回我々は、腎不全下に共通して存在する低酸素症と Klotho 発現低下における炎症惹起のメカニズムを検討するため、腎尿細管細胞において低酸素下による RIG-I、IFN- α/β の発現とその経路、および、野生型マウス (WT マウス) と Klotho ノックアウトマウス (Kl^{-/-}マウス) において低酸素で誘導される RIG-I、IFN- α/β 発現の変化について検討した。

方法：

1. 低酸素チャンバーにより低酸素条件 (1%O₂) を作製し、チャンバー内で 30、60、90、120 分間培養した正常ラット腎尿細管(NRK-52E)細胞において、RIG-I および IFN- α/β の発現を、ウェスタンブロット法を用いて評価した。
2. RIG-I を標的とする siRNA を NRK-52E 細胞に導入後、低酸素チャンバーによる低酸素条件下で 30 分、60 分、120 分間培養し、RIG-I および IFN- α/β の発現を、ウェスタンブロット法を用いて評価した。
3. IgA 腎症と診断されたヒト腎生検組織サンプルを用いた。ヒト腎組織サンプルを免疫染色し、RIG-I および IFN- α/β の発現レベルを評価した。RIG-I と IFN- α/β の発現レベルの相関について検討した。
4. 三種混合麻酔下において、WT マウス、および、Kl^{-/-}マウスの左腎動脈を 10 分間結紮後に屠殺し、腎虚血モデルを作製した。それらのモデルにおいて、RIG-I および IFN- α/β の発現レベルをウェスタンブロット法と免疫染色を用いて評価した。

結果：

1. NRK-52E 細胞実験において、低酸素刺激により RIG-I は低酸素 30 分で有意な上昇を認めた。IFN- α では 30 分で有意な上昇がみられ、その上昇は 120 分まで持続した。IFN- β は 60 分で有意な上昇を認めた。これにより、腎においても、低酸素状態で RIG-I、IFN- α/β の発現が増加す

ることを確認した。

2. RIG-I をノックダウンした NRK-52E 細胞において低酸素刺激を行うと、IFN- α/β の発現は低下した。

3. IgA 腎症と診断されたヒト腎組織による実験では、RIG-I の発現レベルは IFN- α/β の発現レベルとそれぞれ正の相関を認めた。

4. WT マウスにおいて、虚血モデルは非虚血モデルよりも RIG-I と IFN- α/β の発現は増加した。また、K1^{-/-}マウスの虚血モデルは、WT マウスの虚血モデルよりも、RIG-I と IFN- α/β はそれぞれ、さらに発現が増加した。

結論：

最初に、ラット尿細管細胞において、低酸素状態で RIG-I と IFN- α/β の発現は増加し、さらに IFN- α/β の発現には RIG-I が寄与していることが明らかになった。IgA 腎症患者における腎生検組織においても、RIG-I と IFN- α/β の発現は有意な相関を示したことから、実際に腎疾患を発症した患者においても RIG-I が IFN- α/β 産生に寄与している可能性が示唆された。さらに、動物実験においても、WT マウスでは、低酸素刺激で RIG-I と IFN- α/β の発現が亢進した。K1^{-/-}マウスを用いた実験では、WT マウスよりも低酸素刺激による RIG-I と IFN- α/β の発現亢進はさらに増強し、腎で発現する Klotho が低酸素症とともに RIG-I と IFN- α/β の発現に関わっていると考えられた。

本研究の成果は、慢性腎不全に共通した病態である低酸素症によって惹起される炎症が、腎不全で Klotho 発現が低下することによって、さらに増強することを示したものであり、RIG-I 活性化の制御が、慢性腎臓病の新たな治療ターゲットであることが示唆された。