

氏名	山村 裕理子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	医学
学位授与番号	博 甲第5652号
学位授与の日付	平成30年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文題目	High calcium enhances the expression of double-stranded RNA sensors and antiviral activity in epidermal keratinocytes (高濃度カルシウム環境下でケラチノサイトの二本鎖RNA受容体の発現と抗ウイルス活性は増強する)
論文審査委員	教授 山田雅夫 教授 加藤宣之 教授 草野展周

### 学位論文内容の要旨

TLR3, MDA5, RIG-I (二本鎖 RNA 受容体) は表皮ケラチノサイトに発現しており, 自然免疫や獲得免疫の免疫応答を促進することで免疫応答において重要な役割を果たしている。細胞外カルシウム濃度の上昇がケラチノサイトの分化に寄与していることは広く知られているが, 二本鎖 RNA 受容体への影響は知られていない。我々は高濃度細胞外カルシウム濃度下で表皮ケラチノサイトにおいて二本鎖 RNA 受容体発現と抗ウイルス活性にどのような変化を生じるか調べた。正常ヒト表皮ケラチノサイト (NHEKs) を高カルシウム濃度の培養下で培養し, 合成二本鎖 RNA である poly (I:C) で刺激, TLR3, IFIH1 (MDA5), DDX58 (RIG-I) 発現を qPCR で定量, IFN- $\beta$ , ヒト  $\beta$  ディフェンシン 2 (HBD2) 発現を ELISA で定量した。TLR3 の局在は免疫蛍光抗体染色で評価した。抗ウイルス活性は 1 型単純ヘルペスウイルス (HSV-1) を使い, ブラックアッセイで評価した。カルシウム高濃度下では NHEKs で TLR3, IFIH1, DDX58 の mRNA 発現量は著明に亢進しており, また poly (I:C) を介した抗 HSV-1 活性は著明に亢進していた。抗ウイルス効果を有する抗菌ペプチド HBD2 の産生はカルシウム高濃度下で poly (I:C) を介して亢進が認められた。我々の研究結果からは細胞外カルシウム高濃度によって表皮ケラチノサイトにおいて二本鎖 RNA 受容体の発現亢進や抗ウイルス活性の賦活が引き起こされることが示唆されると考えられる。

### 論文審査結果の要旨

2 本鎖 RNA 受容体である TLR3, MDA5, RIG-I は, 表皮ケラチノサイトに発現しており, 自然免疫や獲得免疫の免疫応答を促進することが知られている。ケラチノサイトについて, 細胞外カルシウム濃度が, その分化に寄与していることは広く知られているが, 2 本鎖 RNA 受容体への影響については知られていなかった。

本研究では, 正常ヒト表皮ケラチノサイトを, 高濃度細胞外カルシウム濃度下で培養し, TLR3, MDA5, RIG-I の発現を定量的 PCR で定量した。その結果, 高濃度細胞外カルシウム環境下 (0.5-2 mM) では, 対照の 0.06 mM に比べて, 濃度依存的, かつ 48h, 72h, 96h と時間を追うごとに, TLR3, MDA5, RIG-I の発現を増強することを示し, TLR3 については蛍光抗体法でも発現の増強を確認した。さらに, ケラチノサイトへの単純ヘルペスウイルス 1 型の感染実験において, Poly (I:C) 処理単独でのブラック減少に比べ, 高濃度細胞外カルシウム濃度と Poly (I:C) 処理を組み合すことにより, より強いブラック減少を認めた。この増強には, 抗ウイルス効果を有する抗菌ペプチド HBD2 が主に関与したと考えられた。

委員からは, 実験で用いたカルシウム濃度は, 表皮の生理的条件と合致するか等について質問があり, 本研究者は的確に解答した。

本研究は, ヒト表皮ケラチノサイトにおいて, 高濃度細胞外カルシウム環境下で, 2 本鎖 RNA 受容体である TLR3, MDA5, RIG-I の発現が増強することを示したのものとして, 価値ある業績と認める。

よって, 本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。