

論文審査の要旨

報告番号	総研第 493 号	学位申請者	郡山 豊泰
審査委員	主査	西 順一郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	堀内 正久	副査 石塚 賢治
	副査	井上 博雅	副査 原 博満

***Legionella pneumophila* infection-mediated regulation of RICTOR
via miR-218 in U937 macrophage cells**

(*Legionella pneumophila* は、マクロファージ様U937細胞に感染するとmiR-218を介してRICTORを制御する)

レジオネラ症は、感染症法の4類感染症に規定されており重症の肺炎を引き起こす。また、日本では年間2000人が感染しており年々増加傾向を示している。その *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) は、エアロゾルとして経気道感染し、肺で肺胞マクロファージに貪食され、細胞質内で増殖を繰り返す通性細胞内寄生菌である。近年、細胞内寄生体である細菌と免疫に関する microRNA (miRNA) の関わりが注目されている。細胞内寄生菌での microRNA の動態は、主に miR-155 と miR-146 が免疫応答で重要な役割を担っている。今回学位申請者は、「レジオネラ菌感染がマクロファージに及ぼす形質変化の分子機序解明」を目的とし、次の2点について *in vitro* で検討をおこなった。(1) *L. pneumophila* をマクロファージ(宿主)に感染させたときのマクロファージの miRNA 発現量の量的・質的变化を検討した。(2) 得られた結果より miR-218 に注目し、miR-218 が *L. pneumophila* 感染したマクロファージにどのような機能変化をもたらすかを検討した。細胞実験は、ヒト単核球系細胞 (U937 細胞) を使用し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA: 50ng/mL) で2日間分化させたものをマクロファージ様細胞として使用した。細胞毒性評価試験は LDH cytotoxicity kit (TaKaRa) を使用し、miRNA および mRNA の発現はリアルタイムPCRを使用した。蛋白質発現の評価は、ウェスタンブロット法を用いた。今回、miR-218 のターゲットとした RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin) は、mTOR 複合体の mTORC2 の構成タンパク質の一つである。RICTOR は、主に AKT をリン酸化することで細胞の生存や増殖に関わっている。RICTOR のノックダウンおよび miR-218 の発現増強、減弱には、Lipofectamine RNAiMAX と RICTOR silencing RNA および miR-218 mimics・miR-218 inhibitor を細胞内に導入し、細胞機能変化を解析した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかになった。

1. *L. pneumophila* 感染により、マクロファージ様 U937 細胞は miR-218 の発現を増強した。
2. *L. pneumophila* 感染した U937 細胞は、miR-218 のホスト遺伝子 *SLIT2*・*SLIT3* の両方の発現を増強した。
3. 細胞内の miR-218 量を増強あるいは減弱させても、細胞毒性はみられなかった。
4. U937 細胞に *L. pneumophila* を感染させると RICTOR 蛋白質の発現は濃度依存的に減弱し、AKT のリン酸化も同様に減弱した。さらに miR-218 をノックダウンさせた U937 細胞に *L. pneumophila* 感染させても RICTOR 蛋白質の発現は変化しなかった。
5. *L. pneumophila* 感染した U937 細胞での RICTOR mRNA の発現 (MOI = 0~2.5) は、有意な変化は認められなかった。
6. RICTOR 蛋白質をノックダウンさせ、*L. pneumophila* を感染させると、炎症性サイトカイン (IL-6 と TNF- α) は増強した。反対に内因性 miR-218 を減弱させ *L. pneumophila* を感染させると炎症性サイトカインの産生は減弱した。

今回、申請者は *L. pneumophila* 感染によるマクロファージのサイトカイン産生の制御に、miR-218 が関与することと、miR-218 で発現が抑制される RICTOR の役割を初めて明らかにした。これまで *L. pneumophila* 以外の細菌感染時における免疫応答で miR-155 や miR-146 が重要な役割を担うことが報告されているが、mTOR 関連分子 RICTOR の細菌感染への役割については報告がない。増殖、生存シグナルを担う RICTOR と感染症への関与の可能性を見出した点は興味深い。よって、本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。