



Title	DEAD-Box helicase 6分子による炎症誘導の分子機構 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	内藤, 正一郎
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15908号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/92135
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	NAITO_Seiichiro_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 内藤 正一郎

学位論文題名

DEAD-Box helicase 6 分子による炎症誘導の分子機構

(Analysis of the molecular mechanism of inflammation induction by DEAD-Box helicase 6)

【背景と目的】

炎症性サイトカインの代表とも言うべき Interleukin-6 (IL-6)は、免疫、炎症反応の他、造血、骨代謝、胚発生にも関与する。我々のグループは IL-6 シグナルの過剰な活性化の分子機構として、組織非免疫細胞における IL-6 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)シグナルと Nuclear factor-kappa B (NF-κB)シグナルの同時活性化から生じる過剰な NF-κB 活性化である『IL-6 アンプ(炎症回路)』を 2008 年に見出し、疾患動物モデルはもとより、ヒトの関節リウマチ(RA)、多発性硬化症などの疾患に関与すること、いくつかの疾患感受性遺伝子が NF-κB シグナルの増強を通じて IL-6 アンプを活性化することを報告してきた。しかしながら IL-6 アンプの制御因子群・標的遺伝子群による炎症性疾患の病態形成における作用機構に関して、未だ不明な点が多い。

本研究では、我々のグループが 2013 年に報告した非免疫系細胞における 1000 以上の IL-6 アンプ標的候補遺伝子と、既報の RA、全身性エリテマトーデス、強皮症の疾患関連遺伝子のデータを組み合わせ、疾患に関与するメカニズムが未だ解明されていない DEAD-box helicase ファミリーメンバー、DDX6 を選択して解析した。

DEAD-box helicase ファミリーは、アミノ酸配列 Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) を含む保存されたモチーフを共有するファミリータンパク質群である。これらのタンパク質は RNA 二重鎖を一本鎖にほどく作用を持つ RNA helicase であり、RNA 代謝の様々な局面で重要な役割を果たしている。その一員である DDX6 は当初、messenger RNA (mRNA)が分解される過程で重要なステップであるデキャッピング (mRNA 5'キャップ構造の除去)を促進する翻訳抑制因子として同定された。その他、これまでの研究から、DDX6 は micro RNA を介した RNA 分解や翻訳阻害、RNA co-sensor として Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)のシグナル伝達を亢進する作用を持ち、またストレス顆粒形成、相分離などの生物学的現象に関与することが明らかになっている。様々な細胞プロセスへの関与を示唆する証拠がある一方で、DDX6 が炎症性疾患と関連する作用機構については未だ確立していない。

本研究の目的は、DDX6 の IL-6 アンプ活性化との関連性を明らかにし、その分子機構を解明することである。

【対象と方法】

IL-6 アンプにおける DDX6 の機能を確認するため、siRNA を用いて DDX6 ノックダウン細胞を作出し、IL-6 と Tumor necrosis factor-α (TNFα)の同時刺激下において誘導される IL-6 や各種ケモカインの mRNA 発現を quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)で解析した。また、DDX6

complementary DNA を挿入したプラスミドを作製して過剰発現系を構築し、IL-6 プロモーターや NF- κ B response element (RE)を用いてレポーター活性を測定した。また、DDX6 の helicase 活性が IL-6 アンブに關与するかを検討するため、helicase 活性を失活させた DDX6 変異体を用いてレポーターアッセイを行った。DDX6 を過剰発現させた細胞を用い、免疫沈降法を行うことで DDX6 と結合する分子の探索を行った。さらに、分子メカニズムを絞り込むため、DDX6 ノックダウン細胞に対しサイトカイン刺激を行い、ウェスタンブロットィングおよび免疫細胞染色を用いてシグナルパスウェイに關わる分子の動態を評価した。次に、同様の現象が *in vivo* でも觀察されるかを確認するため、imiquimod により誘導される皮膚炎マウスモデルを用いて DDX6 のノックダウン実験を行った。

【結果】

siRNA 法により DDX6 の発現制御を行った細胞に、TNF- α と IL-6 による IL-6 アンブ刺激をしたところ、IL-6 の mRNA 発現は低下した。一方で、DDX6 を過剰発現した細胞では IL-6 プロモーターおよび NF- κ B RE の活性が有意に亢進した。さらに、helicase 活性を失活させた DDX6 変異体についても野生型 DDX6 と同様に NF- κ B RE の活性を有意に亢進させた。また、マウス皮膚炎モデルにおいても DDX6 のノックダウンにより炎症は抑制された。DDX6 過剰発現系を用いた免疫沈降法により、DDX6 は Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) と結合することを見出した。

ウェスタンブロットィングの結果、DDX6 ノックダウン細胞において I κ B α のリン酸化および分解、NF- κ B p65 536 番目の Serine 残基(Ser536)のリン酸化は抑制されなかった。さらに DDX6 ノックダウン細胞を免疫蛍光染色により觀察したところ、NF- κ B p65 の核内移行は抑制されなかった。

【考察】

本研究では、(i) 非免疫細胞において DDX6 の発現を抑制することにより IL-6 アンブの活性化が抑制されること、(ii) DDX6 を強制発現させると IL-6 アンブの活性化が亢進すること、(iii) DDX6 を siRNA により抑制することで imiquimod 処理により C57BL/6 マウスで誘導される NF- κ B を介した炎症反応が抑制されること、(iv) DDX6 は TRAF2 の N 末端領域と直接結合すること、以上を明らかにした。従って、DDX6 は TRAF2 と直接結合することにより、NF- κ B 経路における正の制御分子となる可能性があると推測された。DDX6 は、その構造から RNA helicase である可能性が報告されている。我々は DDX6 の RNA helicase を構築し、NF- κ B RE 上でのレポーター活性を解析した。その結果、DDX6 は RNA helicase 活性に關係なく、NF- κ B RE 上のレポーター活性を増強することが示され、DDX6 が TRAF2 や Receptor interacting protein (RIP)、Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD)などのシグナル伝達分子と結合するアダプター分子として機能していることが示唆された。

このことから DDX6 は NF- κ B 経路における TRAF2 下流の、I κ B α 分解及び NF- κ B 核内移行を促進すると仮説を立てたが、予想に反して DDX6 knockdown によっては I κ B α 分解及び NF- κ B 核内移行は抑制されなかった。よって、今後は NF- κ B 核内移行後の転写活性の制御など、NF- κ B 経路におけるその他のメカニズムへの關与について検討する必要がある。

【結論】

DDX6 は NF- κ B 経路を介した IL-6 アンブを活性化し、炎症を増悪させる可能性が示唆された。DDX6 は TRAF2 に結合するが、その NF- κ B 経路下流の I κ B α 分解及び NF- κ B 核内移行には影響を与えなかった。